

Studien zur Expression
hepadnaviraler Genprodukte
in vivo und in vitro

vorgelegt von
Diplombiologe Thomas Weimer
aus Wiesloch

Disbui. München
1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0015

**Studien zur Expression
hepadnaviraler Genprodukte
in vivo und in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplombiologe Thomas Weimer
aus Wiesloch

-1988-

Erstgutachter: Prof.Dr. August Böck

Zweitgutachter: Prof.Dr. Wolfhart Bandlow

Sondergutachter: PD Dr. Hans Will

Tag der mündlichen Prüfung: 3.5.1989



meiner geliebten Karin



..und dem Virus, das mich drei Jahre lang beschäftigte

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden drei Fragenkomplexe zur Genexpression der Hepadnaviren untersucht. Welche Rolle spielen die Genprodukte des Murmeltier Hepatitis Virus bei der Entstehung hepatozellulärer Karzinome? Wird das Pol-Leseraster, das Sequenzhomologien zu reversen Transkriptasen von Retroviren zeigt, in vivo exprimiert und welche Strategie wird dabei angewandt? Und schließlich, wie entsteht HBeAg, ein wichtiger Marker der HBV Infektion?

Im Murmeltier/WHV-Modell wurde erstmals ein für Tumorgewebe charakteristisches Proteinmuster beschrieben, das sich deutlich von dem in der akuten und chronischen Infektion unterscheidet. Es zeichnet sich durch das Fehlen des Nukleokapsidantigens und ein geändertes Muster der Oberflächenantigene Pre-S1 und Pre-S2 aus. Die Akkumulation vom Pre-S1 in Hepatozyten könnte zytotoxisch sein und einen direkten Beitrag zur Tumorentstehung leisten. Das geänderte Proteinmuster im Tumorgewebe konnte teils auf Methylierung chromosomal integrierter Virus-DNA zurückgeführt werden. Da die in allen untersuchten Tumorgeweben zusätzlich vorhandene episomale Virus-DNA nicht methyliert ist, muß es weitere Mechanismen geben, die für das veränderte Expressionsverhalten ursächlich sind.

Die Expression des Hepatitis B Virus Pol-Leserasters in vivo wurde erstmals durch den Nachweis Pol-spezifischer Antikörper in Patientenserum indirekt nachgewiesen. Durch Epitopkartierung konnten zusätzlich drei immunogene Domänen auf dem Pol-Protein lokalisiert werden.

Die vermutlich im Pol-Leseraster kodierte reverse Transkriptase von HBV kann in vitro durch einen Rasterwechsel der Ribosomen während der Translation als Fusion an das Nukleokapsidantigen exprimiert werden, eine Strategie, die Retroviren zur Synthese ihrer Polymerase verwenden. Mit Hilfe von Mutanten wurde gezeigt, daß an drei verschiedenen Stellen innerhalb der Sequenz, in der das Nukleokapsid- und Pol-Gen überlappen, Rasterwechsel während der Proteinbiosynthese stattfinden können.

Im carboxyterminalen Bereich des Pol-Proteins wurde eine weitere enzymatische Domäne, die für den Replikationszyklus der Hepadnaviren notwendig ist, durch Aminosäuresequenzvergleiche festgelegt. Es handelt sich um eine Ribonuklease H, die die Degradation des Prägenoms während der reversen Transkription übernimmt.

Der Biosyntheseweg des Hepatitis B e Antigens, eines in der Diagnostik wichtigen Infektionsmarkers, wurde in vitro untersucht. Es zeigte sich, daß die sogenannte preC-Region des Nukleokapsidantigens das Protein an Membranen dirigiert und kotranslational abspaltbar ist. Diese Prozessierung stellt den ersten Schritt bei der Entstehung des e Antigens dar.



Die vorliegende Arbeit wurde von Anfang September 1985 bis Anfang Dezember 1988 im Labor von Dr. Hans Will am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München angefertigt.

Ich möchte an dieser Stelle meinem wissenschaftlichen Lehrer Dr. Hans Will für sein Engagement, die mir zugestandene wissenschaftliche Freiheit und zahllose fruchtbare Diskussionen danken, insbesondere auch für die Möglichkeit, an den Hepatitis B Virus Meetings in Cold Spring Harbor und San Diego teilzunehmen, wo ich einen Teil der im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse vortragen konnte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Karin für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Verständnis und den klaglosen Verzicht auf unzählige gemeinsame Stunden.

Ich danke Florian Schödel für die gute Zusammenarbeit und konstruktive Diskussionen. Ihm und Hans Guldner herzlichen Dank für die Mühe, den Manuskriptentwurf kritisch durchzusehen. Ferner möchte ich Gisela Stahnke für die Oozyteninjektionen, Doris Fernholz für die Tips zur Mutagenese, Rolf Sprengel und Ralf Schneider für manch guten Rat beim 'Computern', Gerhild Wildner für den Monoklonalen, Frau Schimanko (Abt. Oesterheld) für die Synthese der Oligonukleotide sowie dem Rest der Crew für ihre Kooperationsbereitschaft danken.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich außerdem folgende Personen, ohne deren großzügige Bereitstellung von Leber-, Serum- und Plasmidmaterial ein Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Marie-Annick Buendia, Institut Pasteur, Paris; Francis Chisari, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla; Peter van Eerdts und Hans Beljaars, Primatencenter, Rijswijk; Mark Feitelson und Irving Millman, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia; Jutta Hansen und Karin Moelling, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin; Olivier Jean-Jean, Groupe de Biologie et Genetique Moleculaires, Villejuif; Christina Jung, Institut für Immunologie der Universität, München; Brent E. Korba, Georgetown University, Rockville; Massimo Leviero, Università di Roma, Rom; Antonio Ponzetto, Unita Sanitaria Locale, Turin; Mariella Rapicetta, Istituto Superiore di Sanita, Rom; Charles E. Rogler, Albert Einstein College of Medicine, New York; Michael Roggendorf und Hans Wolf, Max-von-Pettenkofer-Institut, München.

INHALT

Seite

EINLEITUNG	1
EINFÜHRUNG IN DIE ARBEIT	8
KAPITEL 1: Hepadnavirale Genexpression in der chronischen Infektion	
und im hepatozellulären Karzinom am Marmosetier/WHV-Modell	10
1.1. Virale Proteine in der WHV-Infektion	
1.1.1. Nukleokapsidproteine in der Leber	12
1.1.2. Pre-S Proteine in der Leber	18
1.1.3. Hepadnavirale Proteine in der Milz	22
1.1.4. Pre-S Proteine im Serum infizierter Marmosetiere	23
1.2. Virale DNA in infizierten Marmosetierlebern	
1.2.1. WHV-DNA in chronisch infiziertem Lebergewebe	29
1.2.2. WHV-DNA im Tumorgewebe	31
Diskussion:- Nukleokapsidproteine in der Leber	37
- Pre-S Proteine in der Leber	38
- WHV-DNA in der Leber	41
- Implikationen für die Tumorgenese	42
- Pre-S Proteine in der Milz und im Serum	43
KAPITEL 2: Die Expression des Pol-Leserasters in vitro und in vivo	45
2.1. Ein ribosomaler Rasterwechsel führt zur Synthese von C/Pol-Proteinen in vitro	
2.1.1. Theoretische Überlegungen zum Rasterwechsel	48
2.1.2. Konstruktion von Plasmiden zur in vitro Transkription	51
2.1.3. Die Translationsprodukte des Pol-Rasters sind mit RNA assoziiert	52
2.1.4. Nachweis eines ribosomalen Rasterwechsels	58
2.1.5. Andere Translationssysteme: Weizenkeimextrakt und Oozyten	63
2.1.6. Deletionsmutanten zur Lokalisierung des Rasterwechsels	65
2.1.7. Punktmutanten	71
Diskussion: - Die Synthese von C/Pol-Proteinen durch ribosomalen Rasterwechsel	77
- Rasterwechsel auf Translations-, nicht auf Transkriptionsebene	77
- Zur Effizienz der Rasterwechsel	78
- Zur Lokalisierung der Rasterwechsel	79
- Rasterwechsel mit hoher Effizienz	81
- Rasterwechsel mit niedriger Effizienz	82
- Bedeutung des in vitro beobachteten C/Pol-Rasterwechsels	
für die Synthese der reversen Transkriptase in vivo	83

2.2. Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten des Carboxyterminus von Pol zu bekannten RNaseH-Molekülen	86
2.3. Nachweis von Antikörpern gegen Pol-Proteine in Seren HBV-infizierter Patienten	90
2.3.1. Konstruktion der SP6/Pol-Plasmide	90
2.3.2. Immunpräzipitation von Patientenseren	91
2.4. Funktionelle Studien mit in vitro synthetisierten Pol-Proteinen	96
2.5. Abschließende Diskussion	103
KAPITEL 3: Studien zur Expression des precore Proteins	105
3.1. Vergleich der preC-Region mit Signalpeptiden	106
3.2. Prozessierung des precore Proteins in vitro	107
3.3. Precore Proteine in chronisch WHV-infizierten Murmeltierlebern	109
Diskussion	110
IN VITRO TRANSLATIONSSYSTEME - EIN RESUMEE	112
MATERIAL	115
METHODEN	121
EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	141
LITERATUR	142
ANHANG	157
ABKÜRZUNGEN	161

Einleitung

Die Hepadnaviren

Das Hepatitis B Virus (HBV) wird mit dem Marmoset Hepatitis Virus (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV; Summers et al., 1978), dem Erdhörnchen Hepatitis Virus (Ground Squirrel Hepatitis Virus, GSHV; Marion et al., 1980), dem Enten Hepatitis B Virus (Duck Hepatitis B Virus, DHBV; Mason et al., 1980) und dem Graureiher Hepatitis B Virus (Heron Hepatitis B Virus, HHBV; Sprengel et al., 1988) zur Gruppe der Hepadnaviren (Hepatotrope DNA Viren; Gust et al., 1986) zusammengefaßt. Diese Viren zeichnen sich durch eine ähnliche Morphologie, typische Genomstruktur und Genorganisation, ähnliche Genomgrößen, ausgeprägte Wirtsspezifität sowie durch einen relativen Lebertropismus aus.

Zur Biologie und Pathogenese von Hepadnaviren

Die Infektion des Menschen mit HBV führt zur akuten Hepatitis B, einer unterschiedlich schweren Krankheit, die durch Leberentzündung mit mehr oder weniger ausgeprägtem Leberschaden charakterisiert ist. Die Virusvermehrung in der Leber ist nicht zytotoxisch; verschieden schwere Leberschäden werden auf Unterschiede in der Immunantwort des Wirts gegen virusinfizierte Zellen zurückgeführt (Dudley et al., 1972; Dienstag, 1984). Die primäre Infektion ist meist selbstbegrenzend, nach einiger Zeit verschwinden die viralen Antigene aus Leber und Blut; es entwickelt sich eine dauerhafte Immunität gegen Reinfektion. In fünf bis zehn Prozent der Patienten persistiert die Leberinfektion. Sie kann asymptomatisch verlaufen oder zu schweren Leberentzündungen und Leberschäden führen (Hoofnagle und Alter, 1984). Die Zahl der chronischen Virusträger wird weltweit auf ca. 200 Millionen geschätzt (Szmunn, 1978), die das Reservoir zur Weiterverbreitung des Virus darstellen. Verglichen mit gleichaltrigen Nicht-Virusträgern geht mit der chronischen Infektion ein über 200fach erhöhtes Risiko einher, an Leberkrebs zu erkranken (Beasley, 1981).

HBV ist relativ wirtsspezifisch, neben dem Menschen konnten bisher nur Schimpansen infiziert werden (Maynard et al., 1972). In permissiven Wirten findet man virale Nukleinsäuren und Antigene vor allem in Leberzellen, es wurden aber auch virale DNA-Sequenzen in niedriger Kopienzahl in peripheren Bluteukozyten und im Knochenmark nachgewiesen (Romet-Lemonne et al., 1983).

Ein großes Problem bei der Erforschung der Hepadnaviren stellte ein lange Zeit nicht vorhandenes Zellkultursystem zur Virusvermehrung dar. Experimente waren daher auf in vitro Systeme und die Tiermodelle beschränkt. Erst kürzlich wurden Hepatomzelllinien beschrieben (Sureau et al., 1986; Tsurimoto et al., 1987; Yaginuma et al., 1987), die zwar nicht mit Hepadnaviren infiziert werden können, aber nach Transfektion mit viraler DNA eine Replikation der Hepadnaviren ermöglichen und zu infektiösen Viren führen (Acs et al., 1987).

Zur Virusmorphologie

In HBV-Präparationen aus menschlichem Serum sind im Elektronenmikroskop drei Arten von Viruspartikeln zu erkennen: a) 42nm Partikel, die intakte Virionen darstellen und nach ihrem Entdecker 'Dane'-Partikel genannt werden (Abb.1), b) 20nm sphärische Partikel, die gewöhnlich in 10^3 - 10^6 -fachem Überschuß gegenüber den Virionen vorliegen, und c) Filamente von 20nm Durchmesser und variabler Länge (Dane et al., 1970). All diese Partikel enthalten ein 24 Kilodalton (Kd) Glykoprotein auf der Oberfläche, das Hepatitis B Oberflächenantigen (Hepatitis B Surface Antigen, HBsAg).



Abb.1. Struktur des Hepatitis B Virus. Das Virus besteht aus einer äußeren Hülle und einem Nukleokapsid. In die Lipidmembran der Virushülle sind mindestens drei Oberflächenantigene (Pre-S1, Pre-S2 und HBsAg) in glykosylierter und unglykosylierter Form eingelagert. Das Nukleokapsid besitzt eine ikosaedrale Struktur und besteht aus ca. 180 Molekülen des Nukleokapsidantigens (HBcAg). Im Innern des Nukleokapsids befinden sich das partiell doppelsträngige DNA-Genom mit genomgebundenem Protein sowie eine Polymerase.

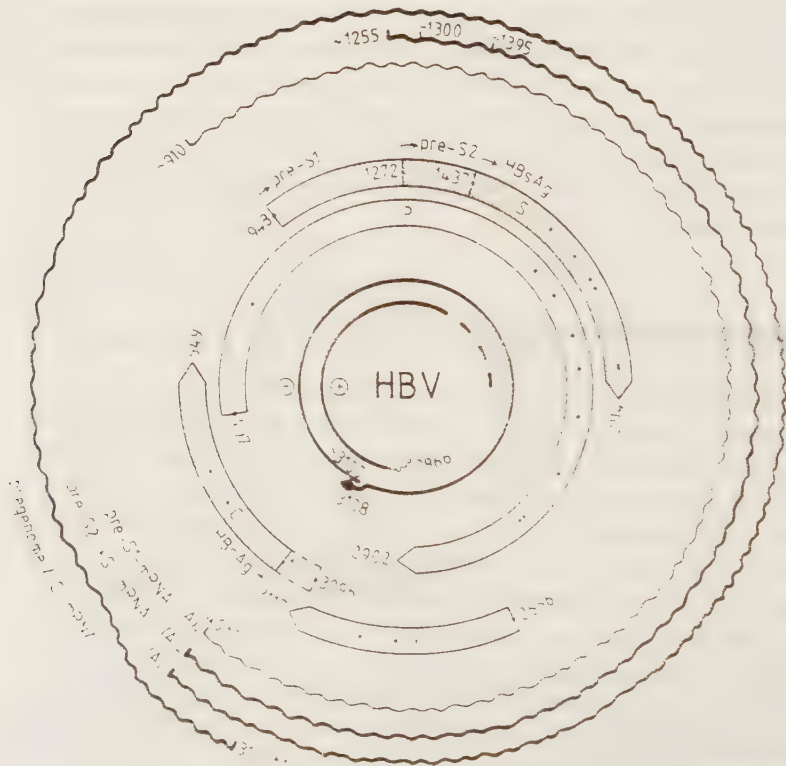
Während Dane Partikel dieses Protein nur auf ihrer äußeren Hülle haben, bestehen die sphärischen und filamentösen Strukturen zum größten Teil aus diesem Antigen und assoziierten Wirtslipiden. Diese nichtinfektiösen leeren Hüllen -sie enthalten keine virale DNA- könnten gegen die Oberflächenantigene gerichtete neutralisierende Antikörper adsorbieren, die während der Infektion gebildet werden (Pugh et al., 1987).

Entfernt man die äußere Hülle des Dane-Partikels mit nichtionischen Detergenzien, tritt das Nukleokapsid zutage (Almeida et al., 1971), dessen Strukturkomponente das Hepatitis B Core Antigen (HBcAg, Abb.1), ein basisches Phosphoprotein von 21.5 Kd, darstellt. Das Nukleokapsid besitzt eine ikosaedrale Struktur und besteht aus je ca. 180 Molekülen HBcAg (Onodera et al., 1982). Es beherbergt die virale DNA, ein partiell doppelsträngiges DNA-Molekül (Deliuss et al., 1983) von ca. 3180 Basenpaaren (Galibert et al., 1979; Pasek et al., 1979; Valenzuela et al., 1979). Der zur mRNA komplementäre DNA-Strang (DNA-Minus-Strang) hat etwas mehr als volle Genomlänge (Will et al., 1987) und trägt an seinem 5'-Ende ein kovalent gebundenes Protein (Gerlich und Robinson, 1980). Der kürzere DNA-Plus-Strang hat ein definiertes 5'-Ende, an das ein kurzes Oligoribonukleotid -das als Primer für die DNA-Plusstrangsynthese dient- gekoppelt ist; sein 3'-Ende ist variabel. Die Zirkularität des Genoms entsteht durch Basenpaarung der beiden DNA-Stränge mittels eines kohäsiven Überlapps von etwa 220 Basenpaaren. Mit dem Nukleokapsid assoziiert sind eine Proteinkinaseaktivität (Albin und Robinson, 1980), die das Nukleokapsidprotein phosphorylieren kann, sowie eine DNA-Polymeraseaktivität, die den partiellen Doppelstrang auffüllen kann (Kaplan et al., 1973).

Zur Genorganisation, den Transkripten und viralen Proteinen

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz (Galibert et al., 1979; Pasek et al., 1979; Valenzuela et al., 1979) verschiedener Isolate von HBV wie auch der Tierviren enthüllte außerordentlich komplexe Genome. Jedes Nukleotid wird für mindestens ein Leseraster benutzt -GSHV bildet mit einer 15 Basenpaare intergenischen Region eine Ausnahme-, die Hälfte der Sequenz wird in mehr als einem Leseraster gelesen. Konservierte Initiationskodons innerhalb eines Rasters führen zu verwandten, koterminalen Proteinen. So ist das S-Gen in drei Subregionen gegliedert, deren Translationsprodukte Pre-S1, Pre-S2 und HBsAg Proteine der Virushülle darstellen und sich nur am Aminoterminus durch die Benutzung der verschiedenen Initiationskodons unterscheiden (Abb.2). HBsAg ist der Hauptbestandteil der leeren Hüllen (s.o.), im Virion sind die Oberflächenproteine und deren glykosylierte Derivate im Verhältnis Pre-S1:Pre-S2:HBsAg = 1:2:7 vertreten (Heermann et al., 1984; Schödel et al., 1988). Für Pre-S2 wird wegen seiner Eigenschaft, polymeres Serumalbumin zu binden (Machida et al., 1984; Persing et al., 1985; Yu et al., 1985), eine Rolle bei der Interaktion mit dem Virusrezeptor diskutiert, für Pre-S1 eine Rolle beim Aufbau der

Virionstruktur (Persing et al., 1986). Auch das C-Gen (Nukleokapsid) enthält ein vorgeschaltetes Initiationskodon, dessen Translationsprodukt als precore bezeichnet wird. Ein weiteres virales Antigen, HBeAg, das in löslicher Form während der Infektion im Blut zirkuliert (Magnius und Espmark, 1970), entsteht durch carboxyterminale Prozessierung aus C-Genprodukten (Takahashi et al., 1983). Das größte offene Leseraster -es umfaßt drei Viertel des Genoms- wurde wegen einer Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene zu reversen Transkriptasen von Retroviren (Toh et al., 1983) als Pol-Raster bezeichnet und kodiert vermutlich für die virale Polymerase. Allerdings konnte ein solches Protein noch nicht aus Viruspartikeln isoliert werden. Das Protein des vierten, X benannten Leserasters, hat transaktivierende Eigenschaften auf fremde und hepadnavirale Promotoren (Twu und Schloemer, 1987; Spandau und Lee, 1988; Zahn et al., 1988), vermutlich auch in vivo (Seeger, 1988).



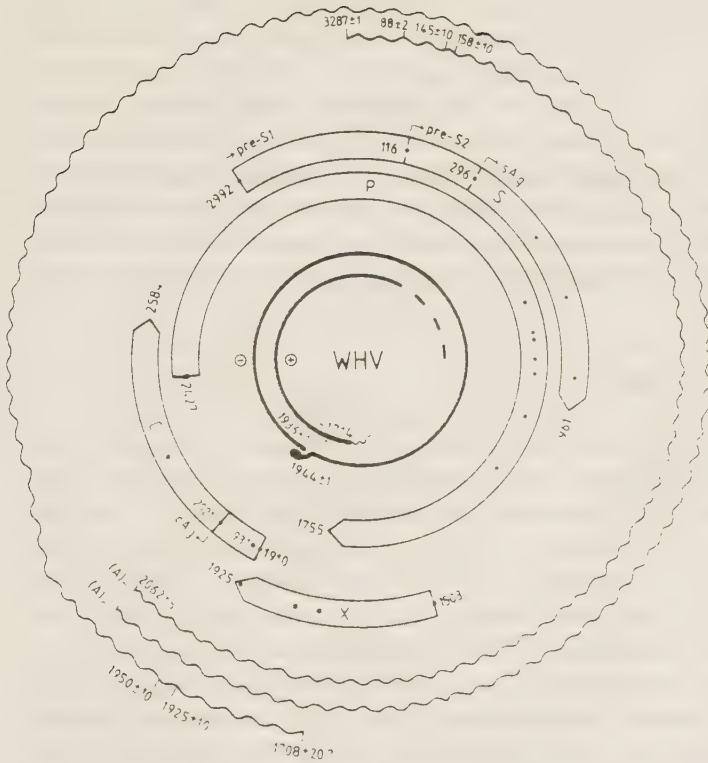


Abb.2. Genomorganisation des Hepatitis B Virus (HBV; Isolat: Galibert et al., 1979; Nomenklatur: Pask et al., 1979) und des Marmelade-Hepatitis Virus (WHV; Galibert et al., 1982). Der innere Kreis zeigt das im Viruspartikel vorliegende partiell doppelsträngige DNA-Genom mit genomgebundenem Protein (●) am 5'-Ende des DNA-Minusstrangs und einem Oligoribonukleotid (~~) am 5'-Ende des DNA-Plusstrangs. Aus den DNA-Sequenzen wurde die Genorganisation abgeleitet, offene Leseraster sind mit der Position von Initiations- (•) und Terminationskodons (>) als offene Pfeile dargestellt. Die Leseraster für die Nukleokapsid- und Oberflächenantigene, denen Proteine zugeordnet werden konnten, sind in der HBV-Karte unterlegt. Gewellte Linien stellen die bisher beschriebenen mRNAs der Viren dar (Cattaneo et al., 1983; Will et al., 1987; Möröy et al., 1985); (A)_n bezeichnet das polyadenylierte 3'-Ende der mRNAs.

Die mRNAs sind, soweit bekannt, ungespleißt, am 3'-Ende koterminal und polyadenyliert. Subgenomische RNAs sind für die Synthese der Oberflächenproteine verantwortlich, wobei ein heterogenes 5'-Ende im Bereich des Pre-S2 AUGs die Translation von Pre-S2 und HBsAg steuert. Die genomische RNA von 3.5 Kb Länge zeigt ebenfalls ein heterogenes 5'-Ende und dient sowohl als mRNA für die Translation von precore und HBcAg als auch als Matrize für die reverse Transkription (s.u.). Kürzlich wurde spekuliert, daß eine nicht polyadenylierte, heterogene Population von Transkripten, die in Leberzellen WHV-infizierter Murmeltiere nachgewiesen wurde, zur Expression des X-Leserasters dienen könnte (Kaneko and Miller, 1988). Für das Pol-Leseraster konnte in vivo bisher keine mRNA nachgewiesen werden; diese ist entweder in sehr geringen Mengen vorhanden und dadurch der Identifizierung entgangen, oder es gibt andere Strategien, dieses Leseraster zu exprimieren, wie interne Initiation der Translation auf der genomischen RNA oder ein Rasterwechsel bei der Translation und Synthese von Fusionsproteinen (s.u.).

Zur Replikation des Virus

Die partiell doppelsträngige virale DNA wird zunächst in infizierten Hepatozyten zu einem kovalent geschlossenen zirkulären Doppelstrangmolekül aufgefüllt. Eine RNA-Polymerase des Wirts (vermutlich Pol II) transkribiert nun diese DNA und stellt neben den mRNAs für die Oberflächenproteine zwei RNA-Spezies her, die sich am 5'-Ende geringfügig unterscheiden; eine dient als mRNA für die preC/C-Proteine (vielleicht auch für Pol), die andere als Matrize für die darauf folgende reverse Transkription (Summers und Mason, 1982) dieser sog. prägenomischen RNA. Das Prägenom wird anschließend bevorzugt in Nukleokapsidpartikel verpackt (Enders et al., 1987), wo die Synthese des ersten DNA-Stranges (Minus-Strang) durch Kopieren der prägenomischen RNA erfolgt. Die reverse Transkription wird wahrscheinlich von der viruskodierten Polymerase-Aktivität katalysiert. Als Primer für die Initiation der DNA-Minus-Strangsynthese dient vermutlich das genomgebundene Protein, das im Pol-Raster kodiert ist (Bosch et al., 1988). Mit einem kurzen RNA-Stück des Prägenoms als Primer wird nun der zweite Strang (Plus-Strang) als Kopie des Minus-Stranges synthetisiert (Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986; Lien et al., 1987; Will et al., 1987).

Zur Assoziation von chronischer Hepadnavirusinfektion mit dem hepatozellulären Karzinom

Es besteht ein weltweiter epidemiologischer Zusammenhang zwischen chronischen Trägern des Virus und dem Auftreten hepatozellulärer Karzinome (HCC; Szmuness, 1978). Das Risiko, ein HCC zu entwickeln, ist für einen chronischen Virusträger um den Faktor 200 höher als für einen

Nichtvirusträger (Beasley et al., 1981). Die beste Evidenz für eine direkte Beteiligung von Hepadnaviren an der Entstehung von HCC kommt von Untersuchungen am Tiermodell WHV/Murmeltier (*marmota monax*). Die Inokulation neugeborener Murmeltiere mit WHV führt in fast 100% der Fälle zu einer chronischen Infektion und beinahe alle chronischen Virusträger entwickeln innerhalb von 17-36 Monaten hepatozelluläre Karzinome (Popper et al., 1987). In diesen Versuchen konnte die Rolle von Kokarzinogenen durch kontrollierte Laboratoriumsbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden.

Regelmäßig zu beobachten, wenn auch nicht in allen Tumoren vorhanden, ist ins Wirtsgenom integrierte virale DNA (Ogsten et al., 1982; Summers et al., 1984; Rogler et al., 1985; Yaginuma et al., 1985; Tokino et al., 1987). Dabei zeigen die zellulären Sequenzen, die als Integrationsorte dienen, keine Beziehung zueinander, die Integration kann in beliebige Chromosomen erfolgen (Summers et al., 1984). Auf viraler Seite wird eine Beteiligung der Einzelstrangregion (Koshy et al., 1983; Shih et al., 1987) und der beiden zur Replikation notwendigen 'direct repeats' (Dejean et al., 1984) bei der Integration diskutiert, wenn auch die Hälfte aller bekannten Integrate innerhalb des doppelsträngigen Bereiches erfolgte (Matsubara et al., 1985). Die integrierte DNA ist häufig stark rearrangiert, es wurden Duplikationen, Inversionen, Deletionen und Multimere beschrieben (Rogler et al., 1985; Yaginuma et al., 1985; Hino et al., 1987; Tokino et al., 1987).

Einführung in die Arbeit

Klonierung und Sequenzierung des Hepatitis B Virus Genoms, die daraus abgeleitete Genorganisation und die Charakterisierung der Strukturproteine stellte die Basis für die Erforschung des viralen Lebenszyklus dar, die verwandten Säuger- und Vogelviren erlaubten Studien im lebenden Organismus. Eine Reihe von Fragen sind offen, wie beispielsweise die Rolle hepadnaviraler Genprodukte an der Entstehung von Lebertumoren, die Expressionsstrategie der zur Replikation notwendigen reversen Transkriptase, oder der Biosyntheseweg des HBe Antigens. Diese Fragen stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Das erste Kapitel beschäftigt sich mit der Genexpression des Murmeltier Hepatitis Virus (WHV) *in vivo*. Spielen virale Genprodukte bei der virusassoziierten Entstehung von Lebertumoren eine Rolle, oder führt die Integration der Virus-DNA ins Wirtsgenom zur Aktivierung zellulärer, tumorinduzierender Faktoren? Werden im Vergleich zur akut oder chronisch infizierten Leber im Tumorgewebe andere, möglicherweise aberrante virale Proteine exprimiert, die mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden können? Durch die Analyse der viralen DNA und Proteine in Tumor- und Nichttumorgewebe soll die virale Beteiligung bei der Entstehung von Leberkarzinomen untersucht werden.

Im zweiten Kapitel wird die Expression des Pol-Leserasters von HBV *in vivo* und *in vitro* analysiert. Ob dieses Leseraster *in vivo* exprimiert wird und, wenn ja, welche Strategie dazu verwendet wird, ist bisher noch unklar. Die Expression *in vivo* soll indirekt durch den Nachweis Pol-spezifischer Antikörper gezeigt werden, die in Seren akut und chronisch infizierter Patienten vorhanden sein könnten. Damit wäre gleichzeitig ein neuer Marker der Infektion definiert.

In vitro Translation von *in vitro* transkribierten mRNAs soll die Frage nach dem Syntheseweg der reversen Transkriptase klären helfen. Initiation der Translation an einem Pol-eigenen Initiationskodon oder ein ribosomaler Rasterwechsel mit Fusion der Polymerase an das Nukleokapsidprotein und damit ein vielen Retroviren gemeinsamer Syntheseweg sind denkbar. Funktionelle Studien *in vitro* sollen schließlich die von Toh et al. (1983) beschriebene Homologie des hypothetischen Pol-Proteins zu retroviralen reversen Transkriptasen auf Aktivitätsebene bestätigen.

Im dritten Kapitel soll die Rolle des C-Gens bei der Biosynthese des HBe Antigens untersucht werden. Stellt das Translationsprodukt der preC-Region des C-Gens ein Signalpeptid dar, das das Protein an Membranen dirigiert und zur Sekretion von HBeAg führt?

Die vorliegende Arbeit ist so aufgebaut, daß sich an jedes Kapitel des Ergebnisteils die Diskussion anschließt, die die jeweiligen Erkenntnisse im spezifischen Zusammenhang erörtert und in den Gesamtzusammenhang einbettet. Die Ergebnisse zur Expression des Pol-Gens werden außerdem in einer abschließenden Diskussion zusammengefaßt. Die Eignung der in vitro Translationssysteme für unterschiedliche Fragestellungen wird in einem getrennten Abschnitt besprochen werden.

Kapitel 1:

Hepadnavirale Genexpression in der chronischen Infektion und im hepatozellulären Karzinom am Murmeltier/WHV-Modell

Die Infektion von Murmeltieren (*Marmota monax*) mit dem Murmeltier Hepatitis B Virus (WHV) stellt ein Tiermodell zum Studium virusinduzierter Leberkrankheiten und ihrer Langzeitfolgen wie chronischer Infektion und hepatozellulärem Karzinom (HCC) dar. Die Inokulation neugeborener Murmeltiere mit WHV führt zu einem sehr hohen Prozentsatz (>95%) zu einer chronischen Hepatitis B und fast alle chronischen Virusträger entwickeln innerhalb von eineinhalb bis drei Jahren Lebertumoren (Popper et al., 1987). Virale DNA findet man nicht nur in Leberzellen, sondern auch in peripheren Blutlymphozyten (Korba et al., 1986), im Knochenmark (Korba et al., 1986) und in lymphoiden Zellen der Milz (Korba et al., 1987). Die Virus-DNA in der akuten und chronischen Infektion liegt meist in episomaler Form vor (Dejean et al., 1982). Rogier et al. (1984) beschrieben ein Beispiel einer Integration viraler DNA in der chronischen Infektion mit ca. einer Kopie pro Zelle. Über 95% der WHV-assoziierten Tumoren hingegen enthalten integrierte WHV-DNA in oftmals stark rearrangierter Form (Ogsten et al., 1982; Summers et al., 1984).

Mehrere Modelle für die Entstehung von hepadnaviral induzierten Leberkarzinomen werden diskutiert. Diese Modelle waren meist für die mit Retroviren assoziierte Tumorgenese entwickelt worden. Das häufige Auftreten integrierter WHV-DNA in Lebertumoren führte 1982 zur Adaptation des 'Promoter-Insertionsmodells' (Ogsten et al., 1982) für die Tumorgenese, in dem die Insertion eines viralen Promoters ein zelluläres, Zellproliferation induzierendes Onkogen aktiviert. Die Existenz eines solchen Mechanismus wurde bereits für die lymphoide Leukose, die durch das Aviäre Leukose Virus (ALV) induziert wird, gezeigt (Hayward et al., 1981; Neel et al., 1981). Für Hepadnaviren wird ein einziges frühes Hepatom beschrieben, bei dem die Pre-S Region integrierter HBV-DNA an zelluläre DNA fusioniert ist (Dejean et al., 1986). Diese kodiert für ein Protein, das mit Steroidrezeptoren und dem Produkt des Protoonkogens *erbA* verwandt ist. In diesem Falle wurde die Expression des Fusionsgens allerdings nicht dokumentiert und es ist nicht bekannt, ob dessen Produkt neoplastische Aktivität in Leberzellen hat (Benbrook et al., 1988). In drei WHV assoziierten HCC von Murmeltieren wurde eine erhöhte Expression des Protoonkogens *c-myc* gefunden, allerdings war die WHV-DNA nicht in der Nähe des *c-myc*-Exons insertiert und spielt daher zumindest bei der Aktivierung in *cis* keine Rolle (Möröy et al., 1986). Hsu et al. (1988) beschrieben in einer kürzlich erschienenen Publikation zwei hepatozelluläre Karzinome, bei denen die Integration von WHV-DNA zu erhöhter Transkription von *c-myc* führte. Sowohl die Insertion des viralen Enhancers als auch eine gestörte Kontrolle der *c-myc* Expression scheinen bei der Aktivierung des *c-myc* Gens eine Rolle zu spielen. Hier wurde die Integration der WHV DNA in

direkten Zusammenhang mit der Aktivierung des Protoonkogens und der Tumorentstehung gebracht. Da auch einige Tumoren ohne virale DNA beschrieben wurden, diskutiert man eine ebenfalls für Retroviren formulierte Theorie des 'Hit-and-Run'-Mechanismus (Varmus und Swanstrom, 1982): nach der Infektion von Zellen und der Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom kann es zu Veränderungen in der zellulären DNA wie Punktmutationen, Deletionen, Translokationen oder anderen Rearrangements kommen. Diese könnten die Struktur oder Expression zellulärer Onkogene beeinflussen und eine maligne Transformation initiieren, ohne daß die Präsenz viraler DNA zur Aufrechterhaltung des transformierten Status notwendig wäre. Duplikationen (Yaginuma et al., 1985; Tokino et al., 1987) und Deletionen zellulärer DNA nach HBV-Integration (Rogler et al., 1985) und eine Translokation zwischen Chromosom 17 und 18 mit Deletion von 1.3 Kb der zellulären DNA (Hino et al., 1987) wurden bereits beschrieben.

Hepadnaviren scheinen kein Onkogen zu tragen, das für die Tumorinduktion verantwortlich wäre, wie dies für eine Reihe von DNA- und RNA-Viren bekannt ist (Bishop, 1985; Bishop und Varmus, 1985). Analysen der in Tumorzellen integrierten Virus-DNA ergaben kein universell offen gehaltenes virales Leseraster, das man erwarten würde, wenn ein solches an der Tumorentstehung beteiligt wäre. Letztendlich zeigt das hepadnavirale Genom auch keine Homologie zu bekannten zellulären Genen (Ganem und Varmus, 1987) und trägt daher vermutlich keine transduzierten Gene des Wirtsgenoms, wie man sie von akut transformierenden Retroviren wie dem Rous Sarcoma Virus kennt (Bishop und Varmus, 1985).

Die Beteiligung normaler oder aberranter hepadnaviraler Proteine am Transformationsprozess und an der Entstehung maligner Zellen kann nicht ausgeschlossen werden. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde daher die virale Genexpression in chronisch infizierten Lebergeweben und hepatozellulären Karzinomen untersucht, um nach möglichen Veränderungen beim Übergang von der chronischen Infektion zum Tumor zu suchen. Dabei sollten auch etwaige Unterschiede zwischen einer WHV- und HBV-Infektion erarbeitet werden. Leber- und Tumormaterial von Murmeltieren wurde auf Vorliegen und Form der viralen DNA untersucht und die Expression viraler Proteine wie Nukleokapsid- und Oberflächenantigene studiert.

1.1. Virale Proteine in der WHV Infektion

Die Studien zur Expression hepadnaviraler Proteine in Normal- und Tumorgewebe von Marmosettieren wurden mit Antisera gegen WHcAg und einen Teil der Pre-S Sequenz begonnen. Die Antisera waren durch Expression der Aminosäuren 4-188 von WHcAg und 124-174 des Pre-S Proteins (Abb.1.1) als Fusion mit den ersten 99 Aminosäuren der MS2-Replikase in E.coli (Salfeld, J., 1985; Will, H., unveröffentlicht), anschließende Reinigung der Proteine über präparative Gelelektrophorese und Injektion in Kaninchen gewonnen worden.

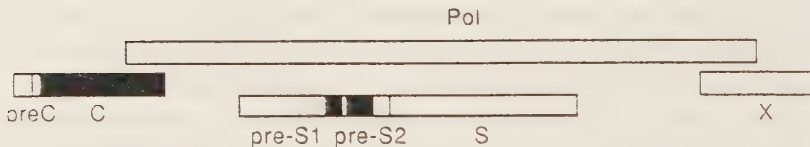


Abb.1.1. Die offenen Leseraster von WHV. Die als Fusionsproteine exprimierten und zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten Teile von WHcAg und der Pre-S Region sind schwarz unterlegt.

Die Lebergewebeproben waren nach der Entnahme aus dem Tier in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt worden. Tumorgewebe war makroskopisch oder histologisch von den freundlicherweise das Material zur Verfügung stellenden Wissenschaftlern identifiziert worden.

1.1.1. Nukleokapsidproteine in der Leber

Abb.1.2.a zeigt das Autoradiogramm eines Western Blots von Leberproben aus chronisch mit WHV infizierten Marmosettieren und entsprechendem Material aus Tumoren mit dem α WHc-Serum. Das dominante C-reaktive Protein in den chronisch infizierten Lebern ist das Nukleokapsidantigen WHcAg mit einem Molekulargewicht von ca. 20500 (a; p20.5^c). Daneben sind weitere C-reaktive Proteine mit Molekulargewichten von etwa 22500 (b) bzw. 27000 (c) nachweisbar; sie konnten precore (p27^{prec}) und aminoterminal prozessierte precore Proteine (p22.5^{prec}) darstellen (siehe auch Kapitel 3).

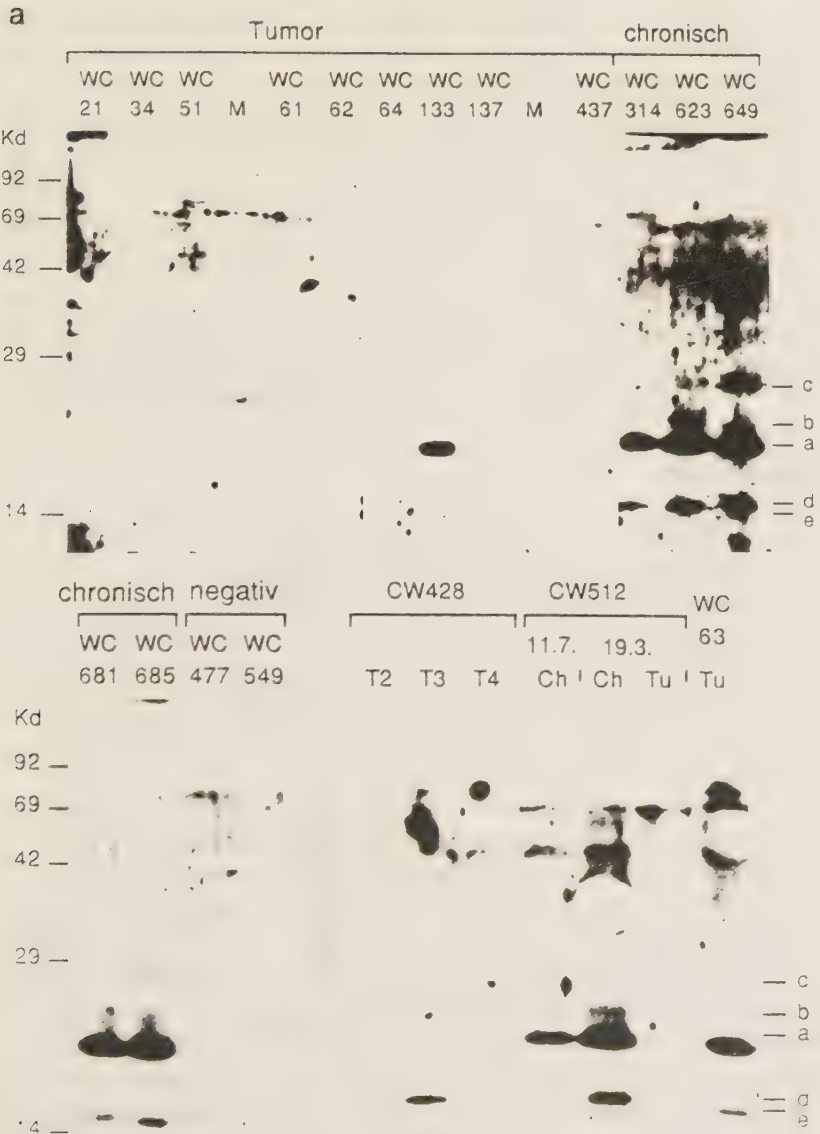


Abb.1.2a. Nukleokapsidantigen-Expression in der Leber. Proteinextrakte wurden auf 17,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose mit α WHc-Antiserum inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch 125 I-ProteinA und anschließende Autoradiographie. WC., und CW., = Bezeichnung der Marmeltiere. a = WHc, b = p27_{proG}, c = p27_{proG}, M = Proteinmolekulargewicht; Kd = Kilodalton

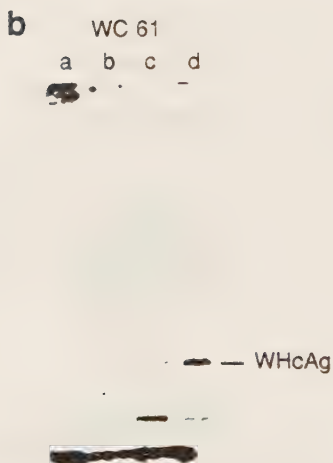


Abb.1.2.b. Darstellung der inhomogenen WHcAg-Expression des Tumors WC61 im Western Blot mit α WHc; 17.5%iges SDS-Polyacrylamidgel. a-d = verschiedene Stücke des Tumors WC61.

Zwei weitere Polypeptide (d und e), die im Laufverhalten 16 (d) und 14 Kd (e) entsprechen, reagierten ebenfalls mit dem Antiserum; es könnte sich hierbei um Degradationsprodukte von WHcAg, WHeAg, oder kreuzreagierende Wirtsproteine handeln.

Die meisten der getesteten Tumorproben (26/31) enthielten keine nachweisbaren Kapsidproteine. In der Probe CW512, wo chronisch infiziertes und Tumorgewebe des gleichen Tieres zur Verfügung standen, ist der Unterschied zwischen beiden Stadien besonders deutlich zu sehen. Im chronisch infizierten Gewebe (Leberbiopsien vom 11.7.S5 [11.7.Ch] und 19.3.86 [19.3.Ch]) sind große Mengen WHcAg vorhanden; im Tumorstück vom 19.3. (19.3.Tu), das aus einem anderen Teil der Leber stammt, ist kein WHeAg mehr nachweisbar. Auch die Leberproben von CW428 enthalten in zwei von drei unabhängigen, d.h. lokal getrennten Tumoren (T2-T4), kein nachweisbares Kapsidprotein. So scheint die Tumorentstehung in WHV infiziertem Gewebe mit dem Fehlen der C-Genexpression einherzugehen. Allerdings sind in knapp einem Sechstel der Proben zum Teil beträchtliche Mengen (WC63, WC133) WHcAg nachweisbar. Da es sich in diesen Fällen um relativ große Leberstücke handelte (Durchmesser bis zu 4cm), lag die Vermutung nahe, daß das Tumorgewebe inhomogen war und chronisch infizierte Nicht-Tumorzellen enthielt. Die Inhomogenität eines solchen 'Tumorstückes' wurde folgendermaßen nachgewiesen. An vier verschiedenen Enden (a-d) des Leberstücks WC61 wurden Proben entnommen und einer Western Blot Analyse mit α WHc unterworfen (Abb.1.2.b). Zwei Proben enthalten WHcAg, bei den beiden anderen ist WHcAg nicht nachweisbar. Um diese Probleme zu umgehen, wurden für die folgenden Experimente von größeren Leberstücken an einer Stelle etwa 1-3g entfernt und unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Dieses Pulver wurde dann als Ausgangsmaterial für weitere Protein- und DNA-Analysen verwendet.

Kreuzreaktion von WHcAg mit Antiseren gegen HBcAg und GSHcAg

Das C-Gen der Hepadnaviren ist gut konserviert. Auf Proteinebene bestehen zwischen HBcAg und WHcAg 33%, zwischen WHcAg und GSHcAg 8.5% Austausche (Schödel et al., 1989). Nachdem gezeigt wurde, daß HBcAg und WHcAg mit den entsprechenden Antiseren in der Immundiffusion kreuzreagierten (Werner et al., 1979), sollte die Kreuzreaktion von WHcAg mit vorhandenen α HBc- und α GSHc-Seren auch im Western Blot untersucht werden. Dazu wurden zwei α HBc-Seren, gerichtet gegen die Aminosäuren 2-183 (α HBc) und 77-175 (α 59/3) von HBcAg, sowie ein α GSHc-Serum, gerichtet gegen die Aminosäuren 4-188 (α GSHc) von GSHcAg, verwendet. Abb.1.3. zeigt die Reaktion der Seren mit Leberproben chronisch (Ch) und nicht infizierter (N) Murmeltiere. Alle drei Seren reagierten mit WHcAg, mit p22.5^{proC}, p27^{proC} und den vermutlichen Degradationsprodukten von WHcAg kreuz.

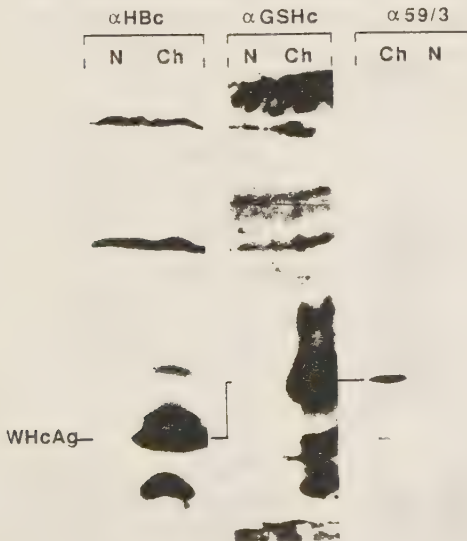


Abb.1.3. Kreuzreaktion von WHcAg mit Antiseren gegen HBcAg (α HBc, α 59/3) und GSHcAg (α GSHc). N = nicht, Ch = chronisch infizierte Leber.

Proteine im Molekulargewichtsbereich über 30000 konnten ebenfalls beobachtet werden. Sie könnten C/Pol-Fusionsproteine darstellen, wie sie von Will et al. (1986) für das Humansystem beschrieben wurden. Diese Vermutung konnte allerdings mangels geeigneter Antikörper gegen die WHV-Polymerase noch nicht bestätigt werden.

a

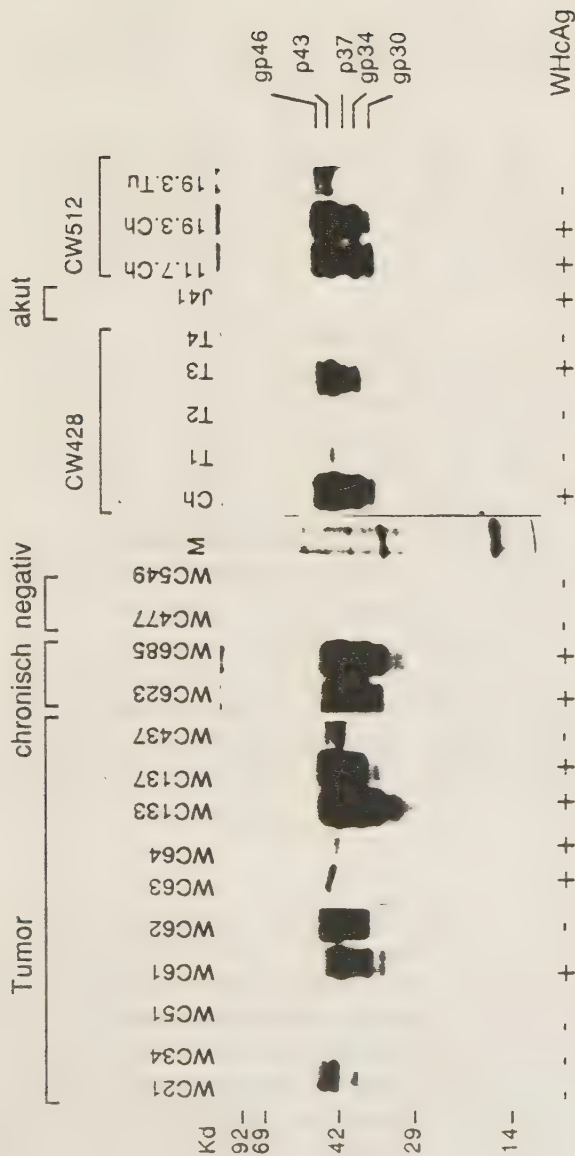


Abb.1.4.a. Western Blot mit α Pre-S (α 24W30) zur Analyse der Oberflächenantigene Pre-S1 und Pre-S2 in Lebern unterschiedlicher Infektionsstadien. Die Proteinextrakte wurden auf 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Ch = chronisch infiziert; T4 = Tumor4; Tu = Tumor; M = Proteingrößenstandard.

Die Deglykosylierung der Pre-S Proteine führte a) zur Reduktion von gp46 und dem Ansteigen der p43-Menge und b) zum Verschwinden der beiden Pre-S2 Banden und dem Auftauchen des unglykosylierten Pre-S2 Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 28000. Dies beweist das Vorliegen der Pre-S1 Proteine in nicht und einfach glykosylierter, sowie der Pre-S2 Proteine in einfach und zweifach glykosylierter Form.

In der Western Blot Analyse mit α Pre-S zeigte sich im Vergleich mit der akuten und chronischen Infektion neben dem Fehlen von WHcAg ein zweites Charakteristikum für Tumorgewebe, nämlich ein geändertes apparentes Mengenverhältnis der Pre-S Proteine. Dies korrelierte in allen Fällen auch mit dem Fehlen von WHcAg. In Abb.1.4.a ist am unteren Bildrand jeweils der Status der WHcAg-Expression angegeben.

Das Verhältnis Pre-S1:Pre-S2 in der einzigen verfügbaren akut infizierten Leber J41 betrug etwa 1:2, während in den chronischen Infektionen ungefähr gleiche Mengen Pre-S1 und Pre-S2 vorlagen. In einigen dieser Lebern war eine Reduktion des einfach glykosylierten Pre-S2 festzustellen. Dem Murmeltier CW512 waren im Abstand von 8 Monaten Leberproben entnommen worden, am 11.7.85 und 19.3.86, als bereits ein Tumor vorhanden war. Die Proteinanalyse zeigte bei der Probe 11.7. ein für die chronische Infektion typisches Pre-S Muster, mit etwa gleichen Anteilen Pre-S1 und Pre-S2. Am 19.3. konnte eine deutliche Reduktion von gp30 im Nichttumor nachgewiesen werden, während sich im Tumor sechsmal mehr Pre-S1 als Pre-S2 befand. WHcAg war nur in den beiden Nichttumorproben nachweisbar, nicht im Tumorgewebe. CW428, als zweites Beispiel, hatte mehrere lokal getrennte Tumoren, die vermutlich auch polyklonalen Ursprungs waren, d.h. unabhängig voneinander entstanden; darauf wiesen die verschiedenen Integrationsorte der WHV-DNA hin (Kap.1.2.2. und Ch.Rogler, persönliche Mitteilung). In drei dieser Tumorproben (T1, T2, T4) war eine deutliche Überexpression von Pre-S1, verbunden mit dem Fehlen von WHcAg, festzustellen. Lediglich eine als T3 bezeichnete Probe zeigte WHcAg-Expression, deren Pre-S Muster allerdings sehr dem Nichttumorgewebe glich, so daß auch hier der Verdacht der Kontamination mit Normalgewebe nahe liegt.

Um zu zeigen, daß es sich bei der veränderten Pre-S Expression in Tumoren um ein generelles Phänomen handelte, wurden die Mengenverhältnisse der Pre-S Proteine in einigen Tumor- und Nichttumorgeweben quantifiziert. Dazu wurde die Schwärzung der Autoradiogramme densitometrisch ausgewertet und der Anteil der jeweiligen Proteine an der Gesamtmenge Pre-S in Prozent ausgedrückt. Die Mengenverhältnisse sind in Abb.1.5. graphisch dargestellt. Deutlich ist eine starke Überrepräsentation von vorwiegend unglykosyliertem Pre-S1 in den Tumorproben zu erkennen, während sich in akut oder chronisch infizierten Geweben Pre-S1 und Pre-S2 in etwa die Waage halten. Auffällig ist eine in allen Proben auftretende Gewichtung für zweifach glykosyliertes Pre-S2 gegenüber dem einfach glykosylierten.

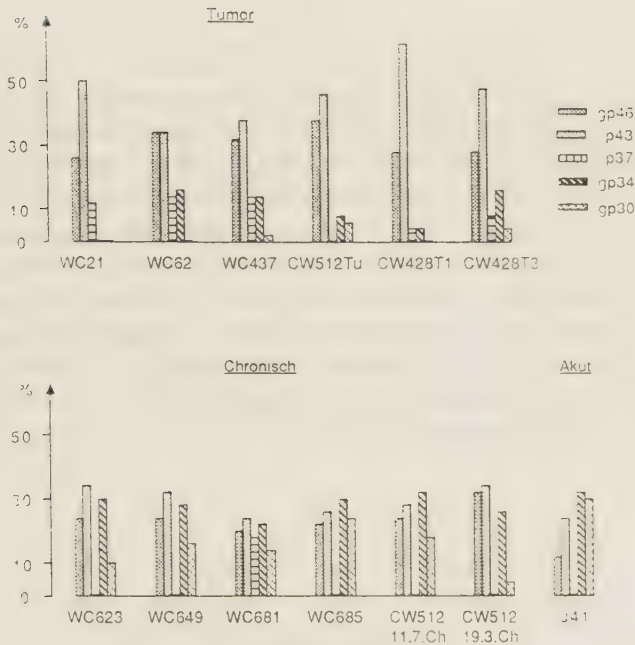


Abb.1.5. Relative Mengenverhältnisse der Pre-S Proteine in akut und chronisch infizierten Lebern sowie in Leberkarzinomen. Es ist in den Tumoren eine starke Gewichtung zugunsten der Pre-S1 Proteine p43 und gp46 zu erkennen, während sich in akut und chronisch infizierten Lebern Pre-S1 und Pre-S2 Proteine in etwa die Waage halten. Die Höhe eines Balkens entspricht dem Anteil des entsprechenden Proteins an der Pre-S Gesamtmenge.

Wie bereits von Heermann et al. (1984) für die Pre-S Proteine von HBV beschrieben, besteht auch bei WHV eine Größenvariation von Pre-S1. So ist beispielsweise das Molekulargewicht beider Pre-S1 Proteine in den Tumorproben WC21, WC62 und WC137 um etwa 1000 erhöht. In HBV wurden die Unterschiede auf Insertionen und Deletionen in der Pre-S Region innerhalb der Subtypen zurückgeführt. Dies könnte auch für WHV zutreffen, denn innerhalb der beschriebenen WHV-Subtypen gibt es in der Pre-S1-Sequenz Längenunterschiede von bis zu 5 Aminosäuren (Galibert et al., 1982; Kodama et al., 1985; Cohen et al., 1988).

1.1.3. Hepadnavirale Proteine in der Milz

Korba et al. (1988) konnten WHV DNA und RNA außer in der Leber auch in anderen Organen nachweisen, so auch in der Milz. Dort findet wie in der Leber aktive Virusreplikation statt, die viralen Nukleinsäuretitern liegen etwa zehnfach unter denen in der Leber. Um die virale Proteinexpression in diesem Organ zu untersuchen, wurden mithilfe der Western Blot Technik und den bereits beschriebenen α WHc- und α Pre-S-Seren Milzproben chronisch infizierter Murmeltiere analysiert. In Abb.1.6. ist das Autoradiogramm des Western Blots abgebildet; es sind jeweils sieben Milzproben chronisch infizierter Tiere und je eine Leberprobe eines chronisch infizierten und eines WHV-negativen Tieres aufgetragen. Die Menge der nachgewiesenen C und Pre-S Proteine war gering, unter fünf Prozent der in der Leber vorkommenden. WHcAg lag bereits an der Nachweisgrenze, konnte aber für 4 von 7 Proben eindeutig bestimmt werden. Die beiden Pre-S1 Proteine waren gegenüber Pre-S2 stark überrepräsentiert.

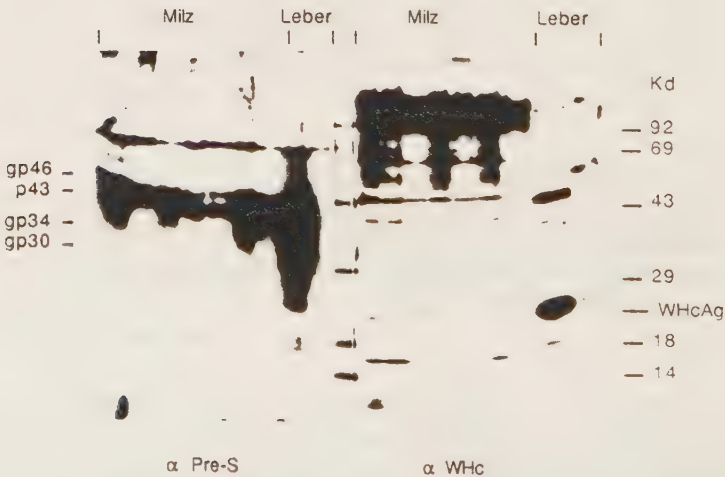


Abb.1.6. Western Blot Analyse zum Nachweis von WHcAg und Pre-S Proteinen in der Milz chronisch infizierter Murmeltiere. Zum Vergleich sind jeweils eine chronisch (links) und eine nicht infizierte Leber (rechts) aufgetragen. In der Mitte des Autoradiogramms befindet sich der Proteingroßenstandard. Kd = Kilodalton; α Pre-S = α 24W30.

1.1.4. Pre-S Proteine im Serum infizierter Murmeltiere

Zur Analyse der viralen Oberflächenantigene im Serum wurde ein Western Blot mit α Pre-S durchgeführt. Abb.1.7. zeigt das Autoradiogramm des Blots von Murmeltierseren mit dem Antiserum gegen Pre-S (α 24W30). Aufgetragen wurde jeweils ein Mikroliter Serum von chronisch und nicht WHV-infizierten Tieren (in 10 μ l SDS-Probenpuffer). Als Referenz diente eine Leberprobe, rechts außen. Pre-S1 lag im Serum zu 60-80% unglykosyliert vor, Pre-S2 konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür war eine Modifikation von Pre-S2 während oder nach der Sekretion, die eine Bindung des Antikörpers verhinderte. Alternativ könnte Pre-S2 während einer WHV-Infektion entweder in so geringen Mengen synthetisiert oder sekretiert werden, daß es ohne Anreicherung nicht nachweisbar ist. Um die erste Möglichkeit zu untersuchen, sollten weitere Antiseren gegen Bereiche des S-Gens hergestellt werden, die a) andere Bereiche von Pre-S2 und b) WHsAg erkennen sollten. Ein α WHs-Antiserum würde das Verhältnis Pre-S1:Pre-S2:WHsAg unabhängig von eventuellen Modifikationen im Pre-S-Bereich verdeutlichen.

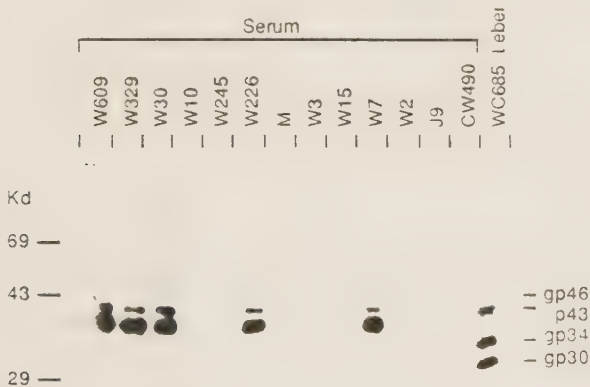


Abb.1.7. Western Blot Analyse von Murmeltierseren mit einem Antiserum gegen die WHV Pre-S Proteine (α 24W30). Zum Vergleich wurde der Extrakt einer chronisch infizierten Leber (WC685) aufgetragen. 15% SDS-Polyacrylamidgel; W., J., CW. = Bezeichnung der Murmeltiere; M = Proteingrößenstandard; Kd = Kilodalton.

Expressionsklonierung zur Herstellung von Antisera gegen Pre-S und WHsAg

Dazu wurden zwei DNA-Fragmente aus der Pre-S- und S-Region in prokaryontische Expressionsvektoren kloniert; diese enthalten vor einem zur Einklonierung von Fremd-DNA geeigneten Polylinker einen Teil des Replikasegens des Bakteriophagen MS2 unter der Kontrolle des P_L -Promoters des Bakteriophagen Lambda; ein hitzelabiler cI -Repressor macht die Proteinsynthese induzierbar (siehe Anhang). Nach Induktion werden Fusionsproteine synthetisiert, die häufig aufgrund ihrer Unlöslichkeit einfach zu reinigen sind.

Die zur Expressionsklonierung verwendeten Fragmente wurden nach einem mit dem Programm PEPLOT (UWGCG Software, Vax Computer) berechneten Hydrophilieprofil (Abb.1.8.a) ausgewählt, einem Maß für mögliche antigene Eigenschaften von Proteinen (Hopp und Woods, 1981). Aufgrund der transmembranen Lokalisation der Oberflächenproteine ist der S-Anteil sehr hydrophob, es gibt nur zwei hydrophile Bereiche, von denen der in Abb.1.8.a gekennzeichnete eine immundominante Aminosäuresequenz in HBsAg darstellt (Peterson, 1988). Diese wurde daher in beide Klonierungen einbezogen. Die Nukleotide für die Aminosäuren 107-340 des Pre-S1 Proteins wurden als EcoRI/DraI-Fragment in EcoRI/HindIII-geschnittenen pEx30a inseriert; die HindIII-Enden waren dazu mit S1-Nuklease geglättet worden. Das Plasmid wurde mit p30Ws12 bezeichnet. P40Ws1 entstand durch Insertion eines BalI/RsaI-Fragmentes (Nt.438-666) in SmaI-linearisierten pEx40b und diente zur Expression der Aminosäuren 252-328. Abb.1.8.b zeigt die als Fusionsproteine exprimierten Pre-S/S-Bereiche.

Induktion und Synthese der Fusionsproteine wurden durch Western Blot Analysen mit anti-MS2-Antikörpern überprüft. Die Molekulargewichte der Fusionsproteine, die in Abb.1.8.c mit Pfeilen gekennzeichnet sind, betrugen 38000 für p30Ws12 und 30000 für p40Ws1. Da MS2-Fusionsproteine unter physiologischen Bedingungen meist unlöslich sind (Küpper et al., 1982), stellte die Extraktion mit steigender Konzentration an Harnstoff eine einfache Reinigungsmethode dar. Die unlöslichen Bestandteile wurden nach Aufschluß der Zellen abzentrifugiert und mit 1M und 7M Harnstoff extrahiert. In der danach noch unlöslichen Fraktion befand sich das Fusionsprotein, das durch präparative Gelelektrophorese weiter aufgereinigt wurde. Die Proteinbande wurde nach Anfärben des Gels mit Coomassie Brilliant Blue ausgeschnitten, durch Elektroelution von Polyacrylamid befreit und dialysiert. Das gereinigte Protein wurde zur subkutanen Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die zur präparativen Gelelektrophorese verwendete Fraktion wurde auf einem analytischen Gel aufgetrennt und ist in Abb.1.8.d gezeigt.

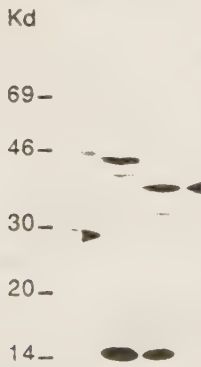
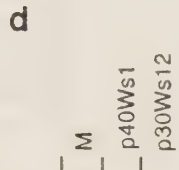
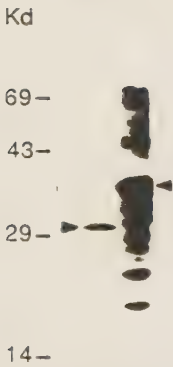
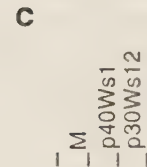
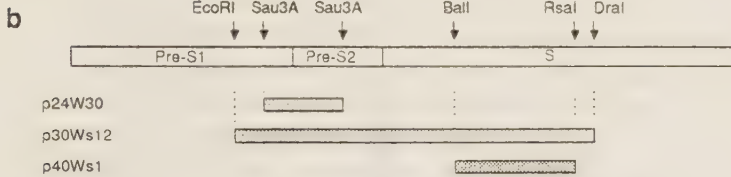
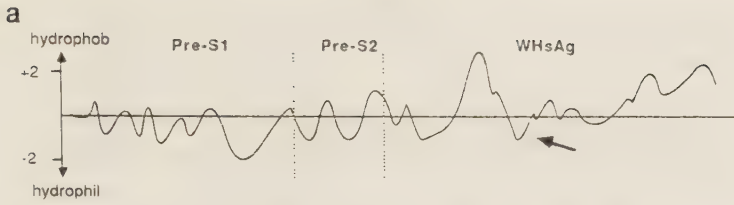


Abb. 1.8. a) Hydrophilieprofil des Pre-S1 Proteins von WHV nach Hopp und Woods (1981). Mögliche antigene Bereiche liegen im hydrophilen Bereich. Der Pfeil kennzeichnet eine immundominante Aminosäuresequenz in HBsAg. b) Darstellung der in die Expressionsvektoren klonierten Pre-S- und S-Bereiche zur Expression von MS2-Fusionsproteinen.

c) Nachweis der Expression von Fusionsproteinen. Bakterienkulturen wurden nach der Hitzeinduktion abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl SDS-Probenpuffer pro ml Kultur aufgekocht; ein Aliquot (10 µl) davon wurde auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte durch Western Blot Analyse mit α MS2-Antikörpern. d) Analyse der zur präparativen Gelelektrophorese verwendeten Harnstoffextrakte. Die Proteine wurde nach der Elektrophorese in Coomassie Brilliant Blue angefärbt; die zur Immunisierung ausgeschnittenen Proteinbanden sind mit einem Dreieck markiert. M = Proteingroßenstandard, in c radioaktiv markiert

Da der als Fusionspartner verwendete Aminoterminus der MS2-Replikase sehr immunogen ist, konnten die Fusionsproteine selbst nicht zur Überprüfung einer erfolgreichen Immunisierung gegen die Pre-S- und S-Domänen herangezogen werden. Es bot sich folgende Alternative: Klonierung der Pre-S/S-Sequenz in einen SP6-Vektor, mRNA-Synthese durch in vitro Transkription, in vitro Translation dieser mRNA und Verwendung der dabei radioaktiv markierten Proteine als Antigene in der Immunpräzipitation mit den Kaninchenseren.

Das auch zur Konstruktion von p30Ws12 verwendete EcoRI/DraI-Fragment wurde in EcoRI/SmaI-geschnittenen pSP64-4 inseriert. Ein zur Initiation der Translation verwendbares ATG stellte der Polylinker des Vektors (siehe Anhang), so daß das in vitro translatierte Protein die gleiche Aminosäuresequenz besaß wie 30Ws12, nur ohne MS2-Anteil. Durch Linearisierung des Plasmids mit HpaII unmittelbar vor dem S-ATG ist eine Translation der Pre-S-Sequenz ohne S-Anteil möglich. Zur Überprüfung S-spezifischer Antikörper wurde das S-Gen durch Insertion eines HpaII-Fragmentes (Nt.291-1608) in AccI-linearisierten pSP64 kloniert. Die Translation initiiert in diesem Fall am S-AUG bei Pos.296 und das entstehende Protein enthält bei entsprechender Linearisierung der Plasmid-DNA (hier: KpnI) das gesamte WHsAg. Die beiden Plasmide wurden mit pSPWpS1 bzw. pSPWs291 bezeichnet; sie sind zusammen mit den für die in vitro Transkription verwendeten Linearisierungen und den entsprechenden Translationsprodukten in Abb.1.9.a aufgeführt.

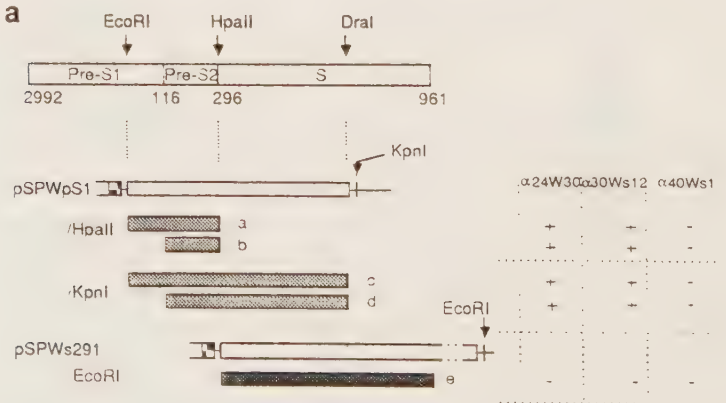


Abb.1.9. a) Konstruktion von pSPWpS1 und pSPWs291 zur in vitro Translation zum Nachweis von α Pre-S- und α WHs-Antikörpern. Das EcoRI/DraI- und das HpaII-Fragment wurden in SP6-Vektoren einkloniert und zur in vitro Transkription mit HpaII, KpnI oder EcoRI (im Polylinker) linearisiert. Die durch in vitro Translation entstandenen und zur Immunpräzipitation der Kaninchenseren benutzten Pre-S- und S-Proteine sind unterlegt und mit a-e bezeichnet. Daneben ist in einer Tabelle die Reaktion der Antiseren mit diesen Antigenen angegeben.

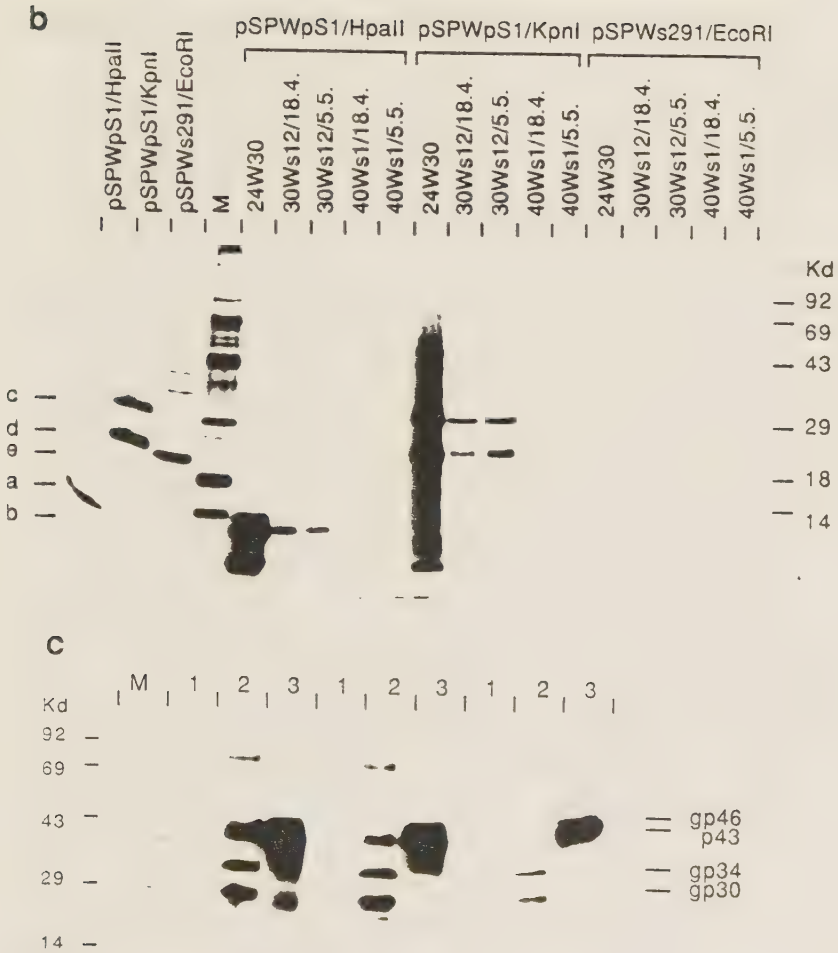


Abb.1.9. b) In vitro Translationsprodukte der RNAs pSPWpS1/HpaII, pSPWpS1/KpnI und pSPWs291/EcoRI (links) nach Gelelektrophorese (17.5%iges SDS-Polyacrylamidgel) und Autoradiographie; diese Proteine dienten als Antigen zum Nachweis der in Kaninchen hergestellten Antikörper. Der rechte Teil des Autoradiogramms zeigt die Reaktion verschiedener Antiseren mit den Proteinen a-e. 18.4. und 15.5. = Abnahmedaten der Seren; die Bezeichnung a-e entspricht dem Schema in Abb.1.9.a: M = Proteingrößenstandard. c) Western Blot Analyse von Murreltierseren (W5, W10, W15) mit den in b) getesteten Antiseren. 17.5%iges Proteingel. 1 = α 40Ws1; 2 = α 30Ws12; 3 = α 24W30; M = Proteingrößenstandard.

Abb.1.9.b zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation *in vitro* synthetisierter Pre-S- und S-Proteine mit den jeweils letzten beiden Abnahmen der Antiseren $\alpha 30\text{Ws}12$ und $\alpha 40\text{Ws}1$; als positive Kontrolle diente $\alpha 24\text{W}30$. Die RNA pSPWpS1/HpaII dirigierte die Synthese zweier Proteine a und b, die durch Initiation der Translation am Linker-AUG (a) bzw. durch interne Initiation am Pre-S2-AUG (b) entstanden und die Aminosäuren 107-251 (a) und 144-251 (b) repräsentieren. Beide Proteine wurden sowohl von der positiven Kontrolle $\alpha 24\text{W}30$ als auch von $\alpha 30\text{Ws}12$ erkannt, wobei letzteres einen wesentlich niedrigeren Titer aufwies. Da $\alpha 24\text{W}30$ gegen die Aminosäuren 124-174 gerichtet war, liegt mindestens eine der von diesem Antiserum erkannten Domänen zwischen den Aminosäuren 144 und 174 im Pre-S2 Bereich. Erwartungsgemäß zeigte hier $\alpha 40\text{Ws}1$ keine Reaktion. Auch die carboxyterminal verlängerten Proteine (pSPWpS1/KpnI) c und d wurden wiederum von $\alpha 24\text{W}30$ und $\alpha 30\text{Ws}12$ erkannt, nicht jedoch von $\alpha 40\text{Ws}1$, obwohl sie die Sequenz des Antigens 40Ws1 beinhalten. Die dritte Immunpräzipitation mit WHsAg als Antigen (translatiert von pSPWs291/KpnI) bestätigte das Fehlen von Antikörpern gegen WHsAg sowohl in den Seren $\alpha 30\text{Ws}12$ wie auch in $\alpha 40\text{Ws}1$. Die Reaktion der Antiseren mit denaturierten S-Proteinen wurde im Western Blot untersucht. Abb.1.9.c zeigt das Autoradiogramm dieser Analyse von drei Serumproben chronisch infizierter Marmosetter mit den Antiseren $\alpha 24\text{W}30$ (3), $\alpha 30\text{Ws}12$ (2) und $\alpha 40\text{Ws}1$ (1). Es ist keine Reaktion mit Proteinen kleiner als 30 Kd zu erkennen, also auch hier keine Reaktion mit WHsAg. Allerdings konnten mit $\alpha 30\text{Ws}12$ die beiden Pre-S2 Proteine im Serum nachgewiesen werden, die durch $\alpha 24\text{W}30$ nicht erkannt worden waren, was auf eine Modifikation von Pre-S2 im Bereich der Antikörperbindungsstelle von $\alpha 24\text{W}30$ hinweist.

HBsAg und WHsAg sind in Radioimmunoassays (RIA) kreuzreaktiv (Feitelson et al., 1981; Cote und Gerin, 1983). Der Versuch, WHsAg mit verschiedenen Antiseren gegen HBsAg im Western Blot nachzuweisen, scheiterte allerdings (Daten nicht gezeigt). Die Kreuzreaktion scheint sich daher auf konformationelle Epitope zu beschränken, die im Western Blot nicht nachweisbar sind.

1.2. Virale DNA in infizierten Murmeltierlebern

1.2.1. WHV DNA in chronisch infiziertem Lebergewebe

Die Analyse der viralen Proteine ergab Unterschiede im Expressionsmuster zwischen chronischer Infektion und Tumor sowohl hinsichtlich des Nukleokapsidantigens als auch der Pre-S1 und Pre-S2 Proteine. Mithilfe der Southern Blot Technik, dem Auftrennen einer DNA-Präparation auf einem Agarosegel, Transfer der DNA auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit radioaktiv markierter, klonierter WHV-DNA (Southern, 1975), wurde die virale DNA in Lebergewebe untersucht, um Hinweise für das im Tumor veränderte Expressionsmuster zu erhalten.

Bedingt durch das am 5'-Ende des DNA-Minusstranges kovalent gebundene Protein war bei der Präparation der DNA aus Gewebe zum Nachweis von Replikationsintermediaten ein Proteaseverdau notwendig; dadurch konnten die verschiedenen Zwischenprodukte der Replikation, deren Minusstränge am 5'-Ende das genomgebundene Protein trugen, nachgewiesen werden; diese waren ansonsten bei der Phenolextraktion unlöslich in der Interphase zurückgeblieben. Die Auswirkungen des Proteaseverdau -üblicherweise wurde Proteinase K verwendet- sind in Abb.1.10. verdeutlicht. Sie zeigt das Autoradiogramm eines Southern Blots mit einer DNA-Präparation aus einer chronisch WHV-infizierten Leber, mit und ohne Behandlung mit Protease K. Ohne Proteaseverdau sind hauptsächlich zwei Banden zu sehen, die das während der Replikation aufgefüllte komplett doppelsträngige virale Genom, in kovalent geschlossener zirkulärer (covalently closed circular, ccc) und offen zirkulärer (open circular, oc) Form, darstellen. Eine schwächere dritte Bande stellt vermutlich einzelsträngige DNA des Minusstrangs (ss) dar, die durch Einwirkung endogener Proteasen das genomgebundene Protein verloren hatte. Je nach Präparation schwankte das Verhältnis von ccc- zu oc-Form, in einigen Fällen war nur ccc zu sehen (vgl. Abb.1.11.). Wurde der Ansatz vor der Phenolextraktion mit Protease K behandelt, waren außer diesen beiden Banden noch Moleküle heterogener Größe nachweisbar. Diese replikativen Intermediate (RI) stellen verschiedene Stadien der DNA-Replikation dar, DNA/RNA-Hybride unterschiedlicher Länge, Minusstränge mit inkompletten Plussträngen, wobei die 5'-Enden der Minusstränge das genomgebundene Protein getragen hatten.

Die Analyse von WHV-DNA in chronisch infiziertem Lebergewebe ergab immer ein Abb.1.11. vergleichbares Bild. Die Gesamt-DNA (Protease K -) wurde hier mit EcoRI geschnitten, ein Enzym, das die bekannten WHV-Subtypen linearisiert. Im ungeschnittenen Zustand ist hauptsächlich die ccc-Form sichtbar, geschnitten ist nur eine Bande zu sehen, die dem linearen Molekül von etwa 3300 Basenpaaren entspricht. Die DNA von WC314 war 30-40 Basenpaare kleiner als die übrigen.

möglicherweise in Folge von Deletionen. Diese konnten nicht im Bereich des S-Gens stattgefunden haben, da die entsprechenden Pre-S Proteine keine Größenreduktion aufwiesen. Es konnten keine höher molekularen Banden, die auf in das Wirtsgenom integrierte WHV-Sequenzen hätten schließen lassen, entdeckt werden.

ProteaseK + -



Abb.1.10. Southern Blot Analyse viraler DNA aus der chronisch infizierten Leber WC685 mit (+) und ohne (-) Protease K-Verdau vor der Extraktion. 1%iges Agarosegel; RI= replikative Intermediate; oc= offen zirkuläre DNA; ccc=kovalent geschlossene zirkuläre DNA; ss= einzelstrangige DNA.

Abb.1.11. Southern Blot Analyse viraler DNA aus nicht (Neg) und chronisch infizierten (Ch) Murmeltierlebern, ungeschnitten (-) oder verdaut mit EcoRI (x). 1%iges Agarosegel; lin= linearisierte DNA; Kb= Kilobasenpaare.

1.2.2. WHV-DNA in Tumorgewebe

Bis auf zwei Tumorproben, die auch keine viralen Proteine enthielten (WC34 und WC51), konnte in allen freie virale DNA nachgewiesen werden. Dies ist ein weitaus höherer Prozentsatz als im Humansystem, wo nur etwa 43% der Lebertumorproben extrachromosomale Virus-DNA enthalten (Fowler et al., 1986). Abb.1.12. zeigt das Autoradiogramm eines Southern Blots mit DNA aus Tumor- und chronisch infizierten Lebern (ProteaseK +; bei WC314 und WC623 wurde nur ein Fünftel der DNA aufgetragen, verglichen mit den anderen Proben). Es sind ccc-, oc-Form sowie replikative Intermediate zu erkennen. Die Menge der freien Virus-DNA in den Tumoren war, verglichen mit der in chronisch infiziertem Gewebe, zumeist deutlich reduziert, etwa um das vier- bis zehnfache; zum Vergleich, siehe CW512, chronische Infektion und Tumor (beide vom 19.3.86).

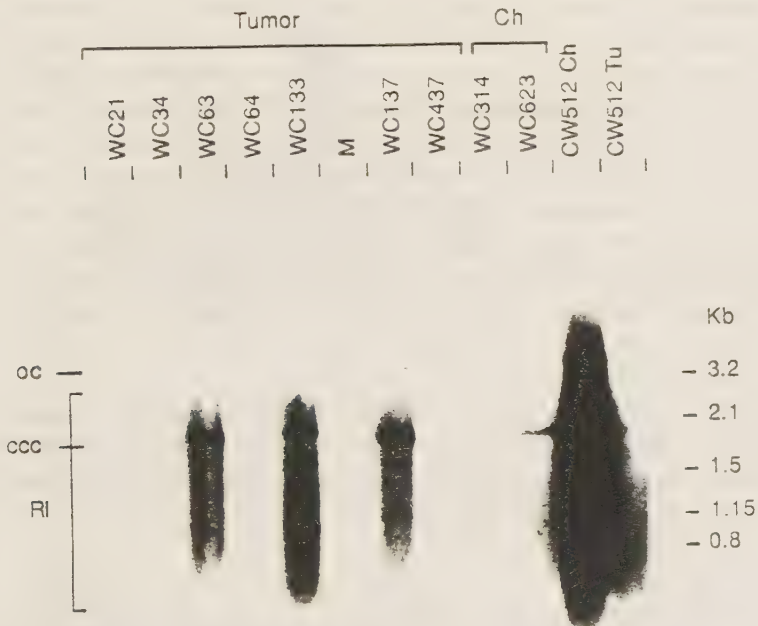


Abb.1.12. Southern Blot Analyse viraler DNA aus chronisch infizierten Lebern (Ch) und aus Lebertumoren (Tu). 1%iges Agarosegel; RI=repplikative Intermediate; oc=open zirkuläre DNA; ccc=kovalent geschlossene zirkuläre DNA; M=Größenmarker; Kb=Kilobasenpaare.

Neben der freien Virus-DNA wurde auch chromosomal integrierte WHV-DNA festgestellt. Die radioaktiv markierte Probe hybridisierte mit der integrierten DNA im hochmolekularen Bereich der chromosomalen DNA, nach Restriktionsverdau erstreckte sich das Bandenmuster ebenfalls in den Bereich bis zu 15 Kilobasenpaaren (vgl. Abb.1.13.b). Die unterschiedlichen Bandenmuster innerhalb verschiedener Tumoren wiesen auf unterschiedliche Orte der Integration in das Wirtsgenom hin.

Da alle Tumoren extrachromosomal vorliegende WHV-DNA enthielten, die sich zumindest von der Größe her nicht deutlich von der in chronisch infiziertem Gewebe unterschied, stellte sich die Frage nach dem Grund für das Fehlen der C-Genexpression. Weshalb hatten Tumoren kein WHcAg, obwohl sie neben womöglich rearrangierter integrierter auch extrachromosomale WHV-DNA enthielten?

Eine Möglichkeit der Genregulation in Eukaryonten stellt die Methylierung von DNA-Sequenzen dar, die häufig zur Repression der Genexpression führt (Bird, 1986). Miller und Robinson zeigten 1983, daß integrierte HBV DNA-Sequenzen in der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 methyliert waren, wobei das S-Gen selten oder überhaupt nicht, das C-Gen aber extensiv methyliert war. Da HBsAg, aber nicht HBcAg in dieser Zelllinie produziert wird, wurde spekuliert, daß die Methylierung für das Abschalten der HBcAg-Expression verantwortlich sein könnte. In einer anderen Arbeit mit menschlichen Epithelzelllinien (Korba et al., 1985) wurde gezeigt, daß Demethylierung des HBV Enhancers zur Induktion des C-Promoters und zur Transkription C-spezifischer mRNA führte. Die virale DNA lag hier ebenfalls in chromosomal integrierter Form vor. Es wird nun im folgenden untersucht werden, ob auch WHV-DNA, integriert und episomal, in den Tumoren methyliert ist und wenn ja, ob diese Methylierung für das Fehlen von WHcAg verantwortlich gemacht werden kann.

Die Methylierung von DNA-Sequenzen kann mithilfe zweier Restriktionsenzyme überprüft werden, die beide die gleiche Basenabfolge, "CCGG", erkennen. HpaII schneidet nur dann, wenn das interne Cytosin unmethyliert ist, MspI arbeitet methylierungsunabhängig. Ein paralleler Verdau ergibt bei Methylierung ein unterschiedliches Bandenmuster.

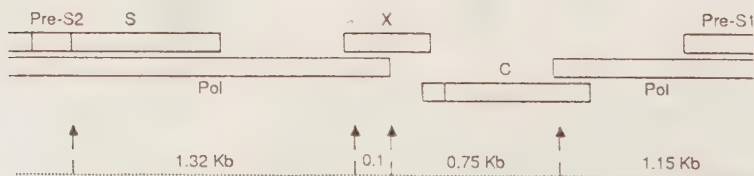


Abb.1.13. a) Lokalisation der Schnittstellen für HpaII und MspI (Pfeile) im WHV-Genom und die Größe der erwarteten Restriktionsfragmente.

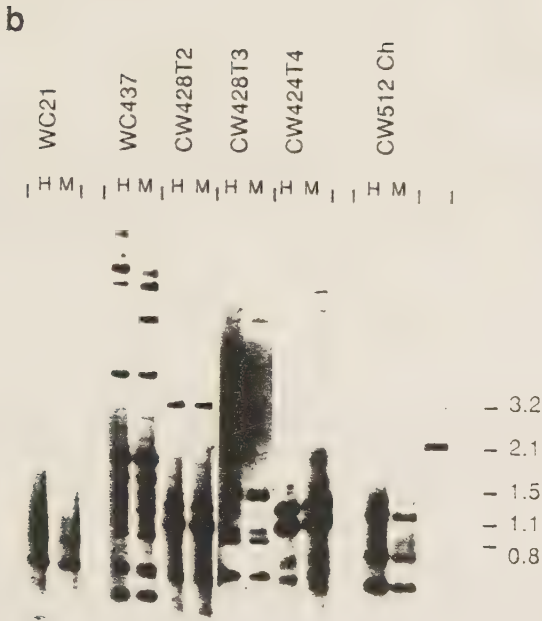


Abb.1.13. b) Southern Blot Analyse viraler DNA nach Restriktion mit HpaII (H) und MspI (M). 1.1%iges Agarosegel.

theoret.	WC21		WC437		CW428T2		CW428T3		CW428T4		CW512 Ch		CW512 Tu	
	HpaII	MspI	HpaII	MspI	HpaII	MspI	HpaII	MspI	HpaII	MspI	HpaII	MspI	HpaII	MspI
			7.9	7.5	15.5				15					
			7.15	7.0		7.9	8.0			6.8				
			5.3	5.5			5.3			5.7				
			3.6	3.6			3.7							
			1.95	1.95										
			1.7	1.7										
				1.5			1.5	1.5						
<u>1.3</u>			<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	1.37	1.37			<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>	<u>1.3</u>
<u>1.15</u>			<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	1.1	1.1	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>	<u>1.15</u>
			0.95	0.95	0.9	0.9			1.08	1.08	0.95	0.95		
<u>0.75</u>			0.65	0.65	0.7	0.7	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>	<u>0.75</u>
			0.5	0.5			0.6	0.6			0.6	0.6	0.6	0.6
<u>0.1</u>			0.45	0.45										
WHcAg	-		-		-		+		-		+		-	
Pre-S1														
Überexpression	+		+		+		+		+		-		+	

Abb.1.13. c) Tabellarische Übersicht der durch HpaII- und MspI-Verdau entstandenen Restriktionsfragmente. Unterstrichen sind die nach einem Verdau einer nicht mutierten, komplett doppelsträngigen WHV-DNA erwarteten Fragmente.

Einige der DNA-Proben aus Tumorgewebe wurden mit HpaII und MspI verdaut und im Southern Blot analysiert. WHV-DNA enthält vier Erkennungssequenzen für diese beiden Enzyme, eine am Beginn des Pol-Rasters, eine am S-ATG und zwei im X-Gen. Deren Lokalisation im viralen Genom und die nach Verdau erwarteten Fragmente sind in Abb.1.13.a abgebildet. Ein Verdau komplett doppelsträngiger WHV-DNA würde Fragmente von 1.32, 1.15, 0.75 und 0.1 Kilobasenpaaren (Kb) ergeben. Bei Methylierung des HpaII-Schnitts im C-Gen würde man beispielsweise statt der beiden 0.75 und 1.15 Kb Fragmente ein 1.9 Kb Fragment erwarten. Das Autoradiogramm des Southern Blots ist in Abb.1.13.b gezeigt. Der Übersichtlichkeit halber sind die gemessenen und erwarteten Fragmentgrößen in der Tabelle 1.13.c zusammengestellt. Da die Resultate für jede Probe unterschiedlich sind, müssen sie getrennt besprochen werden.

Die DNA-Probe des Tumors WC21 hybridisierte mit der radioaktiv markierten WHV DNA im niedermolekularen Bereich, zwischen 0.45 und 1.15 Kb. WC21 enthält daher keine integrierte, sondern nur episomal vorliegende Virus-DNA. Diese zeigt ein abnormes Restriktionsmuster. Das größte der Fragmente entspricht dem 1.15 Kb Fragment, das das 5'-Ende des Pol-Rasters bis zum Beginn des S-Gens enthält. Das Fehlen größerer Fragmente weist a) auf das Fehlen integrierter DNA und b) auf ein Rearrangement des restlichen Genoms hin. Die Summe der Fragmente ergibt 3.7 Kb, 0.4 Kb mehr als das bekannte WHV-Genom. Da in dieser Probe p43 und gp46 (Pre-S1) gefunden wurden, muß zumindest der größte Teil des S-Gens vom Rearrangement verschont

geblieben sein. Veränderungen im C-Gen und dessen regulatorischer Sequenzen könnten hier für das Fehlen von WHcAg verantwortlich sein. Eine Methylierung der viralen DNA-Sequenzen konnte nicht nachgewiesen werden, die Restriktionsverdau mit HpaII und MspI zeigten ein identisches Bandenmuster.

Die DNA aus dem Tumor WC437 zeigte eine Hybridisierung bis in den hochmolekularen Bereich von 8 Kb. Das Auftreten mehrerer Banden, die größer als 1.3 Kb waren, könnte auf mehrere, polyklonale Integrate oder auf 'novel forms' (s.u.) hinweisen. Integrierte wie extrachromosomale Virus-DNA scheinen rearrangiert zu sein, denn von den vier erwarteten Fragmenten konnte nur eines, das 1.3 Kb S/Pol-Fragment, nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Bandenmuster des HpaII- und MspI-Verdau wies auf eine Methylierung zumindest der integriert vorliegenden WHV-DNA hin. Die extrachromosomale DNA ist stark rearrangiert und liegt möglicherweise als sogenannte 'novel form' vor, wie sie erstmals von Rogler und Summers (1982) beschrieben wurde. 'Novel forms' bestehen aus hochmolekularer, zirkulärer Virus-DNA von bis zu 20 Kb, innerhalb derer Duplikationen, Inversionen und Deletionen stattgefunden haben. Das Auftreten des 1.3 Kb Fragments vorwiegend, aber nicht ausschließlich im MspI-Verdau, weist auf eine Methylierung der integrierten DNA in Bereich des S-Gens hin. Weiterhin zeigt das Fehlen der 1.15 und 0.75 Kb Fragmente, daß vermutlich weder die integrierte noch die episomale Virus-DNA ein intaktes C-Gen enthalten und daß somit auch die integrierte DNA kein unverändertes Genomäquivalent enthält. Damit wäre auch hier das Fehlen von WHcAg verständlich.

Die Proben CW428T2, T3 und T4 stammten aus der Leber desselben Tieres. Die unterschiedlichen Restriktionsmuster der hochmolekularen DNAs weisen auf Methylierung, die verschiedenen Fragmentgrößen der einzelnen DNA-Proben auf unabhängige Integrationsereignisse und damit auf den polyklonalen Ursprung dieser Tumoren hin. Nur in T4 war das 1.3 Kb Fragment (S/Pol) vorhanden; in T2 und T3 war dieses offensichtlich vergrößert (1.37 bzw. 1.5 Kb). Alle drei Leberproben enthielten p43 und gp46 (Pre-S1; vgl. Abb.1.4.). Die Insertionen oder Veränderungen scheinen daher das S-Gen unverändert gelassen zu haben. Das C-Gen liegt vermutlich vollständig inklusive des C-Promoters vor, da sowohl das 0.75 als auch das 1.15 Kb Fragment nachgewiesen werden konnten. Dennoch waren T2 und T4 negativ für WHcAg; eine Methylierung der C-Sequenz scheidet damit als Ursache dafür aus.

Mit den Proben CW512 19.3.Ch und 19.3.Tu konnte die Form der WHV-DNA in der chronischen Infektion, WHcAg positiv, normale Pre-S Expression, mit der im Tumor, WHcAg negativ, geändertes Pre-S-Muster, direkt verglichen werden. Die Ergebnisse bestätigten den sich bei den vorangegangenen Proben bereits abzeichnenden Befund, daß die fehlende C-Genexpression im Tumor nicht auf Methylierung der episomal vorliegenden Virus-DNA zurückzuführen ist. Beide DNA-Präparationen zeigten identische Restriktionsmuster und enthielten keine nachweisbare integrierte DNA. Dennoch unterschieden sich die Expressionsmuster dramatisch: der Tumor war WHcAg negativ und nur die beiden Pre-S1 Proteine waren nachweisbar, während in der chroni-

schen Infektion sowohl WHcAg als auch Pre-S1 und Pre-S2 exprimiert wurden. Beide extrachromosomalen DNAs enthalten neben den drei erwarteten Fragmenten von 1.32, 1.15 und 0.75 Kb (und statt des 0.1 Kb) ein Fragment von 580 Basenpaaren, dessen Herkunft unklar ist. Die Intensität der Bande auf dem Autoradiogramm entspricht der der übrigen, so daß ihre Entstehung aus der episomalen DNA gefordert werden muß. Da die Extraktion der DNA ohne Proteaseverdau durchgeführt wurde, kann diese Bande nicht auf partiell einzelsträngige Moleküle mit ungewöhnlichem Laufverhalten zurückgeführt werden. Es bleibt also eine Veränderung der viralen Sequenz zwischen den beiden HpaII/MspI-Schnittstellen im X-Leseraster.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

1. Integrierte WHV-DNA ist häufig methyliert. Dies könnte die Genexpression dieser DNA beeinflussen.
2. Methylierung von extrachromosomal vorliegender WHV-DNA findet nicht statt und kann daher nicht für das Fehlen von WHcAg im Tumor verantwortlich sein.
3. In einigen Fällen haben wahrscheinlich Rearrangements oder Insertionen zu Veränderungen der extrachromosomal vorliegenden viralen DNA geführt, die den Bereich des C-Gens betreffen und dadurch für die fehlende WHcAg-Synthese verantwortlich sein könnten.
4. Mehrere Tumoren enthalten extrachromosomale WHV-DNA, die vermutlich rearrangiert ist, deren C-Gen inklusive Promoter aber intakt zu sein scheinen. Hier könnten Mutationen oder Veränderungen auf Transkriptions- oder Translationsebene zum Abschalten der core Synthese geführt haben.
5. Die Veränderungen der freien Virus-DNA fanden zum großen Teil im Bereich des X-Leserasters statt, im Einzelstrangbereich der Virion-DNA. Der Einfluß auf die Replikation des Genoms und die Aktivität der im Carboxyterminus der Polymerase lokalisierten RNaseH (siehe Kap.2.2.) bleibt zu untersuchen.

Diskussion

In diesem Kapitel wurden die Expression hepadnaviraler Proteine und die Form der viralen DNA in chronisch WHV infiziertem Gewebe und in WHV-assoziierten Tumoren untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß in hepatozellulären Karzinomen von Marmosettieren extrachromosomal vorliegende Virus-DNA weitaus häufiger als in HBV-assoziierten Humanlebertumoren vorhanden ist. Weiterhin ist das Fehlen des Nukleokapsidantigens und ein geändertes Mengenverhältnis zweier Oberflächenproteine für die untersuchten Lebertumoren von Marmosettieren charakteristisch. Diese Unterschiede können teils auf Methylierung integrierter oder Rearrangements integrierter und extrachromosomal vorliegender Virus-DNA zurückgeführt werden, teils erfordern sie Mutationen in kodierenden oder regulatorischen Bereichen oder Veränderungen auf Transkriptions- oder Translations-Regulationsebene.

Nukleokapsidproteine in der Leber

Mehrere C-reaktive Proteinspezies in der chronisch infizierten Marmosettierleber wurden mit Hilfe eines Antiserums identifiziert, das gegen bakteriell exprimiertes WHcAg gerichtet war. Das Nukleokapsidantigen p20.^{5c} stellte das dominante Protein dar. Daneben wurden zwei Proteine, die als p22.5^{prec} und p27^{prec} bezeichnet wurden, identifiziert; sie entsprechen vermutlich precore und aminoterminal prozessiertem precore Protein (vergleiche dazu auch Kapitel 3). Damit gelang zum ersten Mal der Nachweis von Proteinen in vivo, die Vorläufer beziehungsweise Zwischenstufe bei der Synthese von WHcAg darstellen. Analoge Proteine konnten in HBV-infizierten Lebern bisher nicht nachgewiesen werden (Weimer, 1987). Der Grund dafür könnte die wesentlich höhere Kopienzahl der zur Translation benutzten preC-mRNA im Marmosettiersystem sein (Möröy et al., 1985; Will et al., 1987); eine erhöhte Syntheserate könnte die Prozessierung nur eines Teils der precore Proteine zur Folge haben. In vitro Experimente mit precore Proteinen von HBV zeigten, daß nach der kotranslationalen Prozessierung neben der Sekretion ins endoplasmatische Retikulum ein zweiter Weg beschritten wird, nämlich die Rückkehr des prozessierten precore Proteins ins Cytoplasma (Garcia et al., 1987). Das könnte die Existenz von p22.5^{prec} erklären. Eine zweifelsfreie Identifizierung von precore und prozessiertem precore in WHV-infizierten Lebern wird nur mit preC-spezifischen Antiseren möglich sein. Zum Größenvergleich könnten Proteine durch in vitro Translation einer preC-mRNA in Gegenwart von Membranen erhalten werden, ähnlich den in Kapitel 3 beschriebenen Experimenten.

Neben precore und WHcAg erkannte das α WHc-Serum kleinere Proteine, in einem Molekulargewichtsbereich von 14000 bis 16000, für deren Zustandekommen es drei

Erklärungsmöglichkeiten gibt. Zunächst könnten sie durch spezifische Degradation von WHcAg entstanden sein; spezifisch deshalb, weil diese Proteine als diskrete Banden und nicht als heterogene Population in verschiedenen Lebern vorkommen. Weiterhin könnte es sich um intrazelluläres WHcAg handeln; intrazelluläres HBcAg wurde bereits von Mondelli et al. (1986) mittels Immunfluoreszenz in Nuklei und im Cytoplasma infizierter Hepatozyten nachgewiesen. Eine Identifizierung als solches wäre nur durch einen Vergleich mit WHcAg aus dem Serum möglich, das ohne vorherige Anreicherung nicht nachweisbar ist. Als dritte Alternative wäre eine Kontamination der Proben mit Serum-WHcAg denkbar. Keine dieser Möglichkeiten kann bisher ausgeschlossen werden.

Ein charakteristisches Merkmal WHV-assoziiierter Lebertumoren stellte das Fehlen des Nukleokapsidantigens dar. Dies traf auf über 80% der im Western Blot getesteten Tumorphoben zu. Auf mögliche Mechanismen, die die C-Genexpression beeinflussen könnten, wird später eingegangen (s.u.).

Antiseren gegen die Kapsidproteine von HBV und GSHV kreuzreagierten im Western Blot mit WHcAg. Dies bestätigt die Immundiffusionsdaten von Werner et al. (1979) und zeigt eine antigene Konservierung der Proteine nicht nur für konformationsabhängige Epitope.

Pre-S Proteine in der Leber

Die Expression der Oberflächene Proteine Pre-S1 und Pre-S2 wurde mithilfe eines Antiserums gegen die Aminosäuren 124-174 der Pre-S Sequenz untersucht. Es gelang damit erstmals der Nachweis dieser Proteine in der infizierten Leber. Durch Deglykosylierungsversuche konnte gezeigt werden, daß die Pre-S2 Proteine einfach und zweifach glykosyliert sind, und zwar durch an Asparagin gebundene Glykane. Damit wurde die Angabe von Schaeffer et al. (1986) widerlegt, die ohne experimentelle Evidenz Pre-S2 als nicht und einfach glykosyliert beschrieben hatten.

In diesen Studien trat neben dem Fehlen des Nukleokapsidantigens ein zweites tumorspezifisches Charakteristikum zutage, ein geändertes Proteinmuster der Oberflächeneantigene Pre-S1 und Pre-S2. Für diese Beobachtung gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Die erste wäre eine tumorspezifische Dysregulation der Oberflächeneantigenexpression mit einer Überexpression von Pre-S1 gegenüber Pre-S2, die zweite eine tumorspezifische Modifikation der Pre-S2 Proteine, so daß der verwendete α Pre-S Antikörper nicht mehr binden kann.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben kürzlich einen hemmenden Effekt höherer Konzentrationen von Pre-S1 auf die Sekretion von HBsAg. Die Experimente wurden durchgeführt in

Xenopus Oozyten (Persing et al., 1986; Standing et al., 1986), in transgenen Mäusen (Chisari et al., 1986), in Hamsterozellen (Ou und Rutter, 1987) und in retroviralen Expressionssystemen (McLachlan et al., 1987). Chisari et al. (1987) fanden in sieben von zehn Linien transgener Mäuse, die das gesamte S-Gen trugen und Pre-S1 überexprimierten, Zellveränderungen, wie sie in der akut und chronisch infizierten Leber beschrieben wurden (Popper et al., 1987). In drei dieser Mauslinien traten filamentöse HBs-Partikel auf, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Hepatozyten akkumulierten und nicht effizient sekretiert wurden. In einer dieser drei Mauslinien veränderten die Hepatozyten ihre Morphologie während der Ablagerung der Partikel im ER und wurden mit der Zeit nekrotisch. Die Überexpression von Pre-S1 führte hier zu einer reduzierten Sekretion und intrazellulären Akkumulation von HBsAg, und es wurde spekuliert, daß es in dieser transgenen Mauslinie so hohe Konzentrationen erreichte, um direkt zytotoxisch zu sein.

Könnten die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Befunde der erste Nachweis für die Übertragbarkeit der in heterologen Systemen erhaltenen Ergebnisse auf die Situation in vivo sein? Um dies beantworten zu können, muß zunächst kurz auf die Regulation der Oberflächenantigensynthese eingegangen werden. Pre-S2 und S werden vermutlich von derselben mRNA translatiert (Cattaneo et al., 1984; Möröy et al., 1985); Pre-S1 besitzt bei HBV eine eigene mRNA (Will et al., 1987), für WHV ist diese bisher noch nicht identifiziert worden. Eine Dysregulation der Oberflächenantigenproduktion würde also vermutlich Pre-S1 alleine, Pre-S2 und S, oder alle drei betreffen. Eine relative Überexpression von Pre-S1, wie sie in den Tumoren und beginnend in einigen chronisch infizierten Leberproben beobachtet wurde, setzt also zunächst eine Reduktion von Pre-S2 und S oder eine verstärkte Expression von Pre-S1 voraus. Sofern die Ergebnisse der einen transgenen Mauslinie verallgemeinert werden können und eine intrazelluläre Akkumulation von WHs-Partikeln zytotoxisch sein kann, sollte es dann zu einer verminderten Sekretion von WHs-Partikeln und, damit verbunden, zu einer Akkumulation von Pre-S2 und WHsAg in den Hepatozyten kommen. In den Tumoren wurde allerdings genau das Gegenteil beobachtet, eine Reduktion von Pre-S2 im Vergleich zu Pre-S1. Wird Pre-S1 in Hamsterozellen alleine exprimiert, wird es ebenfalls nicht sekretiert und akkumuliert intrazellulär (Ou und Rutter, 1987). Somit könnte auch die alleinige Expression und Akkumulation von Pre-S1 ohne Pre-S2 und WHsAg theoretisch zu den oben beschriebenen pathologischen Veränderungen führen. Leider gab und gibt es noch immer kein Antiserum gegen WHsAg, das im Western Blot einsetzbar wäre, um die Menge an intrazellulärem WHsAg mit der der Pre-S Proteine zu vergleichen.

Eine veränderte Genexpression der Oberflächenproteine könnte mehrere Ursachen haben. Neben den durch die Untersuchungen der viralen DNA im Tumor beschriebenen Rearrangements der chromosomal integrierten wie auch der extrachromosomalen Virus DNA könnten Mutationen in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen, wie beispielsweise dem S-Promoter, aufgetreten sein. Die ebenfalls auf DNA-Ebene nachgewiesenen Veränderungen des X-Gens, dessen transaktivierende Eigenschaften auch virale Promotoren in vivo stimulieren (Seeger, 1988), könnten

die Transkriptionsrate der S-mRNAs reduzieren. Vermutlich betreffen Veränderungen vor oder während der Tumorentstehung nicht nur die Expression viraler, sondern auch zellulärer Gene. Darauf weist die Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors II hin, eines fötalen Wachstumsfaktors, dessen erhöhte Expression in 45% der untersuchten Murmeltier-Tumoren festgestellt und mit der Entstehung der Tumoren in Verbindung gebracht wurde (Fu et al., 1988). Die Initiation der erhöhten Expression ist noch nicht geklärt. Eine dysregulierte Expression zellulärer Proteine wie beispielsweise von Kinasen konnte zur Modifikation und damit verbunden zur Änderung der antigenen Struktur viraler Proteine führen (Sprang et al., 1988). Dies führt uns zur zweiten Erklärungsmöglichkeit für das geänderte Verhältnis zwischen den Pre-S1 und Pre-S2 Proteinen im Tumor: das Verhältnis der Pre-S Proteine zueinander wäre gleich geblieben, aber ein Großteil von Pre-S2 wurde so modifiziert, daß er durch den verwendeten Antikörper nicht mehr erkannt werden konnte. Es wäre dann eine für Tumorgewebe spezifische Modifikation zu fordern, die in allen untersuchten Tumoren gleichermaßen vorhanden war.

Welche der beiden Interpretationsmöglichkeiten zutrifft, Expression von Pre-S1 mit gleichzeitiger Reduktion der Menge an Pre-S2 und WHsAg als Initiator für pathologische Veränderungen der infizierten Hepatozyten, oder tumorspezifische Modifikation von Pre-S2 ohne Veränderung der Pre-S2 Expression, wird nur mit einem geeigneten Antikörper gegen WHsAg entschieden werden können. Dieser müßte alle Oberflächenproteine gleichermaßen und unabhängig von strukturellen Änderungen im Pre-S Bereich erkennen können.

Momentan kann auf der Ebene der viralen Genexpression folgendes als für den Lebertumor charakteristisch bezeichnet werden: das Fehlen des Nukleokapsidantigens WHcAg, und das geänderte Mengenverhältnis zwischen Pre-S1 und Pre-S2.

Heermann et al. (1984) beschrieben eine subtypspezifische Heterogenität der Pre-S Sequenz bei HBV um bis zu elf Kodons, die sich in einem um 1.0-1.5 Kd veränderten Laufverhalten der entsprechenden Pre-S1 Proteine bemerkbar machte. Solche Größenvariationen konnten auch in WHV-infizierten Lebern nachgewiesen werden und sind vermutlich ebenfalls auf Sequenzunterschiede im Pre-S1 Gen einzelner WHV-Subtypen zurückzuführen. Um fünf Kodons ist WHV-1 (Galibert et al., 1982) in der Pre-S1 Region kleiner als die übrigen der beschriebenen Subtypen (Kodama et al., 1985; Cohen et al., 1988). Da nur in 3 von 18 Fällen ein um etwa 1000 höheres Molekulargewicht der Pre-S1 Proteine festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß WHV-1 oder ähnliche den in den untersuchten Lebern am häufigsten vorkommenden Subtyp darstellen.

WHV-DNA in der Leber

In der chronischen Infektion wurde durch Southern Blotting freie virale DNA festgestellt. Es gab keine Hinweise auf chromosomal integrierte WHV-DNA. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen an chronisch HBV-infizierten Patienten, bei denen in bis zu 20% der untersuchten Fälle integrierte HBV-DNA nachgewiesen wurde (Fowler et al., 1986). In einer chronisch infizierten Leber (WC314) wies das virale Genom etwa 30-40 Basenpaare weniger auf als das aus anderen chronisch infizierten Lebern. Die Inspektion der viralen Proteine ergab eine bereits vorliegende Reduktion der Menge des einfach glykosylierten Pre-S2 Proteins, ohne daß sich die Größe der Pre-S Proteine verändert hatte. Hier könnten schon Veränderungen auf dem Weg zum Tumor stattgefunden haben, allerdings außerhalb des S-Gens.

Alle untersuchten Tumorproben (14/16; in den beiden Proben ohne WHV DNA konnten auch keine viralen Proteine nachgewiesen werden) enthielten extrachromosomale Virus-DNA, weitaus mehr als HBV-assoziierte Tumoren (etwa 43%; Fowler et al., 1986). Die Menge an episomaler DNA war deutlich, um das vier- bis zehnfache, reduziert gegenüber der in der chronischen Infektion. Häufig wurde neben der episomalen auch chromosomal integrierte WHV-DNA festgestellt. Dabei waren die Orte der Integration bei Proben verschiedener Tiere wie auch bei mehreren lokal getrennten Tumoren desselben Tieres verschieden, was durch unterschiedliche Restriktionsmuster nachgewiesen wurde. Es gibt daher keine spezifische Integrationsstelle innerhalb des Wirtsgenoms. Lokal getrennte Tumoren waren polyklonalen Ursprungs, das heißt, sie entstanden durch unabhängige Ereignisse und wurden nicht durch Metastasen verbreitet. Außerdem gab es einen Fall (WC437), bei dem offenbar mehrere Integrationsereignisse innerhalb desselben Tumors stattgefunden hatten.

Diese Beobachtungen ergänzten das bisherige Bild der viralen DNA in der chronischen Infektion und im Tumor (Summers et al., 1984; Ganem und Varmus, 1987).

Die vorliegende Studie ging nun einen Schritt weiter und versuchte, die Protein-Expressionsmuster mit dem Zustand der viralen DNA zu verknüpfen und eine Ursache für die fehlende WHcAg-Expression und das geänderte Verhältnis der Pre-S Proteine im Tumor auf DNA-Ebene zu finden. Die Experimente gingen von der Arbeitshypothese aus, daß Methylierung der Virus-DNA dafür verantwortlich sein könnte. Hinweise dafür erbrachten Untersuchungen der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 (Miller und Robinson, 1983) und die Induzierbarkeit des C-Gens in Humanzellen nach Demethylierung einer Sequenz, die damals als C-Promoter angesehen wurde (Korba et al., 1985). Heute ist bekannt, daß in dieser Sequenz ein Enhancer lokalisiert ist, der einen großen Einfluß auf den kurz vor dem PreC-ATG lokalisierten Promoterbereich des C-Gens besitzt (Roossinck et al., 1986).

In der Tat sind hepadnavirale DNA-Sequenzen methyliert, allerdings nur die chromosomal integrierten; diese könnten dadurch in ihrer Expression beeinträchtigt sein (Korba et al., 1985; Bird, 1986). Freie virale DNA war in keinem Fall nachweisbar methyliert, zeigte aber Veränderungen in der DNA-Sequenz, die auf Insertionen und Rearrangements schließen lassen. Zwei der DNAs enthielten kein intaktes C-Gen, was die fehlende WHcAg-Synthese erklärt. Die restlichen fünf Proben, davon eine aus chronisch infiziertem Material, besaßen die beiden 0.75 und 1.15 Kilobasenpaare großen Fragmente, die zusammen das komplette C-Gen inklusive des Promoters tragen. Keine dieser DNAs enthielt allerdings ein komplettes X-Leseraster, hier waren immer Insertionen zu verzeichnen. Veränderungen dieses Fragments, das vermutlich an analoger Stelle zu HBV den WHV-Enhancer enthält, beeinflussen aber höchstwahrscheinlich das Abschalten der WHcAg-Synthese nicht, wie das Beispiel CW512 zeigte. Proben aus dem Tumor- und Nichttumorteil der Leber CW512 zeigten ein identisches Restriktionsmuster mit denselben Veränderungen des 0.1 Kb X-Fragments, einer Insertion von etwa 500 Basenpaaren, aber dramatische Unterschiede im Proteinmuster. Der Tumorteil war WHcAg negativ mit starker Reduktion von Pre-S2, während im Nichttumorteil sowohl große Mengen WHcAg als auch Pre-S2 Proteine gefunden wurden. Es müssen also andere Faktoren als Methylierung oder Rearrangement der viralen DNA für die unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Proben verantwortlich sein. Vorstellbar wären beispielsweise Punkt- oder kleinere Deletionsmutationen in regulatorischen oder kodierenden Sequenzen; diese wären mit den verwendeten Methoden nur detektierbar gewesen, wenn sie die Erkennungsstellen für HpaII/MspI betroffen hätten. Die Analyse der Nukleotidsequenz der extrachromosomalen DNAs von CW512 Tumor und Nichttumor ist nötig, um dies zu überprüfen. Alternativ könnten sich Veränderungen der Transkriptions- oder Translationskontrolle im Tumor ergeben haben, die zunächst die Analyse der RNA notwendig machen würden. Veränderungen könnten auch zelluläre Faktoren betreffen, die für virale Aktivitäten notwendig sind. Dazu gehören der 'nuclear factor I', der für die optimale Aktivität des S-Promoters nötig ist (Shaul et al., 1986) sowie Sexualhormone und Glucocorticoide, die die Expression des HBs-Gens in transgenen Mäusen regulieren (Farza et al., 1987).

Implikationen für die Tumorgenese

Durch die vorliegende Analyse viraler DNA und Proteine in Tumorgewebe kann ein weiteres Modell für die Tumorentstehung formuliert werden. In nahezu allen untersuchten Tumoren konnte die Expression der Pre-S1 Polypeptide nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß in diesen Fällen ein virales Leseraster offen gehalten wurde, ungeachtet von Rearrangements chromosomal integrierter oder episomaler Virus-DNA. Dies trifft auch für etwa sechzig Prozent der näher untersuchten HBV- und WHV-Integrate zu (Ogsten et al., 1982; Koshy et al., 1983; Dejean et al., 1984;

Yaginuma et al., 1985; Rogler et al., 1985; Fowler et al., 1986a; Hino et al., 1986; Berger und Shaul, 1987; Yaginuma et al., 1987a; Shih et al., 1987; Tokino et al., 1987). Die Expression dieser Proteine könnte neben der bereits diskutierten Möglichkeit einer direkten Pathogenese indirekt zur Tumorentstehung beitragen. Die Proteine könnten Ziele für eine zelluläre Immunantwort sein (Dienstag, 1984), die Zerstörung von Leberzellen und damit auch eine ständige Regeneration von Lebergewebe zur Folge hat. Im Zuge dieser Proliferation sind Veränderungen auf zellulärer Ebene möglich, die letztendlich die Tumorentstehung initiieren.

Pre-S Proteine in der Milz und im Serum

Korba et al. (1987) zeigten durch DNA- und RNA-Analysen, daß in der Milz aktive virale Replikation stattfindet. WHV-DNA war in intakten, 27nm Partikeln enthalten, zusammen mit der endogenen DNA-Polymeraseaktivität. Allerdings ist unklar, ob infektiöse Virionen gebildet werden.

Mithilfe der α Pre-S- und α WHc-Antikörper wurden Oberflächen- und Nukleokapsidproteine in der Milz chronisch infizierter Marmosettiere identifiziert. Die Menge der nachgewiesenen Proteine entsprach den beschriebenen niedrigen Nukleinsäuretitern (Korba et al., 1988); sie betrug etwa fünf Prozent der in der Leber. Sowohl WHcAg als auch die Pre-S Proteine konnten nachgewiesen werden; die Ursache für die äußerst geringe Pre-S2 Expression ist noch nicht geklärt. Auch hier muß ein Western Blot mit α WHs das Verhältnis der Pre-S und S Proteine zueinander entscheiden. Erst dann kann die Signifikanz der Überrepräsentation von Pre-S1 beurteilt werden.

Im Serum chronisch infizierter Marmosettiere konnten beide Pre-S Proteine nachgewiesen werden. Nachdem der gegen die Aminosäuren 124-174 gerichtete Antikörper α 24W30 nur Pre-S1 erkannt hatte, wurde ein zweites Pre-S spezifisches Antiserum hergestellt. Das zur Immunisierung verwendete Antigen enthielt die Aminosäuren 107-340, also außer einigen zusätzlichen Aminosäuren der Pre-S1 Sequenz die gesamte Pre-S2 Region und einen Teil von WHs. Im Western Blot erkannte dieses Serum (α 30Ws12) nun auch die Pre-S2 Proteine. Eine mögliche Erklärung gibt Abb.1.14. Die Aminosäure Asparagin in Position 3 von Pre-S2 wird zur Glykosylierung der HBV Pre-S2 Proteine verwendet (Stibbe und Gerlich, 1983). Falls diese Aminosäure an der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung beteiligt ist, und während der Sekretion an die bereits in der Leber vorhandenen Glykane zusätzliche addiert werden (Patzner et al., 1984), könnten diese zu einer sterischen Hinderung der Antikörperbindung führen. Die Tatsache, daß α 30Ws12 diese derart modifizierten Proteine erkennt, impliziert, daß α 30Ws12 entweder einen anderen oder mehrere antigene Bereiche auf der Pre-S Sequenz erkennt, und daß α 24W30 nur eine Bindungsstelle auf

Pre-S2 besitzt, die das Asparagin in Position 3 einschließt. Wenn diese Schlußfolgerungen richtig sind, sollte deglykosyliertes Serum-Pre-S2 mit $\alpha 24W30$ nachweisbar sein.

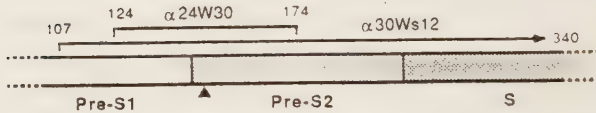


Abb.1.14. Ausschnitt aus dem Pre-S1 Protein von WHV. Mit Klammern begrenzt sind die Bereiche, die als Fusionsproteine exprimiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen innerhalb des Pre-S1 Proteins an, der Pfeil kennzeichnet das vermutlich zur Glykosylierung verwendete Asparagin in Position 146 (entspricht der dritten Aminosäure von Pre-S2).

Kapitel 2:

Die Expression des Pol-Leserasters in vitro und in vivo

Die Replikation der Hepadnaviren beinhaltet die reverse Transkription eines RNA-Prägenoms. Über die Expression der reversen Transkriptase ist wenig bekannt. Toh et al. (1983) beschrieben Aminosäuresequenzhomologien zwischen dem hinteren Drittel des hypothetischen HBV Pol-Proteins und Sequenzen aus den reversen Transkriptasen von Rous Sarcoma Virus (RSV) und Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV). Erste Evidenzen für die Expression zumindest von Teilen des Pol-Leserasters in vivo kamen durch Immunblotanalysen von zwei HBV assoziierten Lebertumoren mit Antiseren gegen bakteriell exprimierte Pol-Sequenzen. Will et al. (1986) beschrieben Proteine mit einem Molekulargewicht von 35000 und 69000, die sowohl mit Antiseren gegen den Aminoterminus des Pol-Proteins als auch mit Antiseren gegen HBcAg reagierten. Diese C/Pol-Fusionsproteine erinnerten an retrovirale reverse Transkriptasen, die zunächst als gag/pol-Polyprotein synthetisiert werden, um dann durch eine viruskodierte Protease in funktionelle Untereinheiten gespalten zu werden (zur Übersicht: Kräusslich und Wimmer, 1988). Sollten auch die Hepadnaviren eine ähnliche Strategie zur Expression ihrer Polymerase verwenden und ein C/Pol-Vorläuferprotein herstellen, wobei die im Tumor beschriebenen Fusionsproteine unvollständig prozessierte Zwischenprodukte darstellen? Es muß hier einschränkend angemerkt werden, daß beide Tumoren integrierte HBV-DNA enthielten. Da solche Integrate alle möglichen Rearrangements aufweisen, besteht die Möglichkeit, daß die C/Pol Proteine von einer aberranten mRNA translatiert wurden, auf der die beiden Leseraster in Phase waren. Gesetzt aber den Fall, der natürliche Syntheseweg ginge über ein Fusionsprotein, wäre die Fusion der beiden Raster durch einen Rasterwechsel der Ribosomen während der Translation zu erklären. Diese Strategie zur gemeinsamen Expression zweier getrennter Leseraster wird von Prokaryonten benutzt (Dayhuff et al., 1986; Weiss et al., 1988), konnte für die gag/pol- (Kapsidantigen/Polymerase) Synthese des Rous Sarcoma Virus (RSV) und des menschlichen Immundefizienzvirus (HIV-1) (Jacks et al., 1985; Jacks et al., 1988) wie auch für die gag/pro- (Kapsidantigen/Protease) und pro/pol- (Protease/Polymerase) Synthese des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) gezeigt werden (Jacks et al., 1987) (Abb.3) und wird als Mechanismus bei der Fusion der Genprodukte F1/F2 des Coronavirus Infektiöses Bronchitisvirus (IBV) diskutiert (Brierley et al., 1987). Das Pol-Raster der Hepadnaviren überlappt das 3'-Ende des C-Gens um 142 Nukleotide und befindet sich im +1-Raster dazu. Die Pol-Gene der Retroviren, wie auch F2 von IBV, sind bezogen auf gag bzw. F1 im -1-Raster; die ribosomalen Rasterwechsel finden unmittelbar am Stopcodon von gag (RSV, MMTV), pro (MMTV) und F1 (IBV) bzw. am Anfang des Überlapps (HIV-1) statt (Abb.3). Sekundärstrukturen auf der mRNA und Polypurine werden hier als Signale zum Rasterwechsel beschrieben. Ein eukaryontischer +1-Rasterwechsel, wie er bei HBV notwendig wäre, wurde vor

kurzem für die Synthese des Fusionsproteins TyA/TyB des Retrotransposons Ty1 aus Hefe (Clare et al., 1988) beschrieben; die für den Rasterwechsel notwendige Sequenz konnte hier auf 14 Nukleotide eingegrenzt werden.

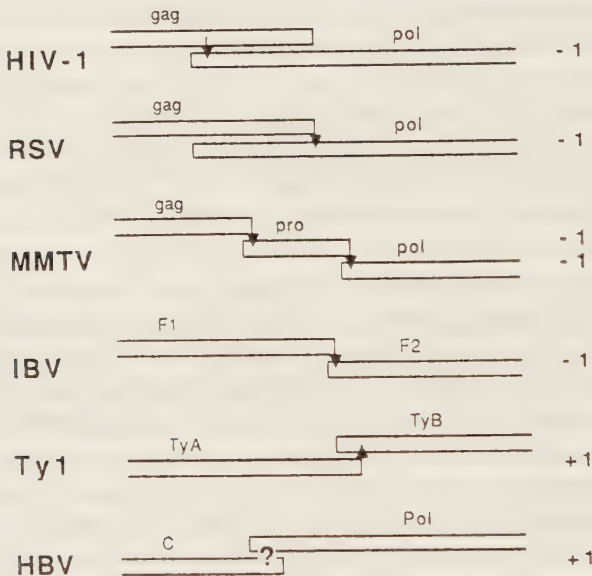


Abb.3. Ribosomale Rasterwechsel zur Fusion zweier Proteine bei der gag/pol-Synthese des menschlichen Immundefizienzvirus (HIV-1; Jacks et al., 1988) und Rous Sarcoma Virus (RSV; Jacks et al., 1985), bei der gag/pro- und pro/pol-Synthese des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV; Jacks et al., 1987), der Synthese des F1/F2 Proteins des infektiösen Bronchitis Virus (IBV; Brierley et al., 1987) und des TyA/TyB Proteins des Hefetransposons Ty1 (Clare et al., 1988). Das erste Leseraster ist definitionsgemäß im 0-Raster, das Raster des zweiten ist jeweils an der rechten Seite mit +1 oder -1 angegeben.

Die fehlende mRNA für die Translation eines am Pol-AUG initiierten Proteins läßt einen ungewöhnlichen Mechanismus der Pol-Genexpression vermuten. Mögliche Synthesewege wären ein ribosomaler Rasterwechsel nach Initiation des Vorläuferproteins am core-AUG, interne Initiation der Translation auf der preC/C-mRNA oder RNA-Editing, d.h. posttranskriptionelle Veränderungen der mRNA. Die Existenz einer Pol-spezifischen mRNA ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, kartiert wurden bisher nur sogenannte 'major RNAs'. mRNAs mit geringer Kopienzahl hingegen könnten durchaus unentdeckt geblieben sein.

Die Fähigkeit des C/Pol-Überlapps, einen ribosomalen Rasterwechsel zu unterstützen, sollte in einem *in vitro* Translationssystem untersucht werden, wie es bereits für den Nachweis eines Rasterwechsels bei der gag/pol-Synthese von RSV benutzt worden war (Jacks et al., 1985). Dazu wurden mRNAs *in vitro* synthetisiert und in einem zellfreien System *in vitro* translatiert. Die Proteine wurden immunologisch mit Antikörpern gegen HBcAg und Pol nachgewiesen, C/Pol-Fusionsproteine wurden durch gelelektrophoretische Komigration mit artifiziellen C/Pol-Proteinen und Immunreaktion mit beiden Antisera identifiziert.

Reverse Transkription während des Replikationszyklus erfordert die Aktivität einer Ribonuklease H (RNaseH), eines Enzyms, das während der Synthese des ersten DNA-Stranges die prägenomische RNA degradiert, um die Matrize für die Synthese des zweiten DNA-Stranges freizumachen. Durch Sequenzvergleiche wurde die RNaseH-Domäne einiger Retroviren in der zweiten Hälfte des Pol-Polyproteins lokalisiert (Johnson et al., 1986). Kürzlich bestätigten Hansen et al. (1988) und Tanese et al. (1988) die Lokalisation der RNaseH in der vorhergesagten Region mit biologischen Experimenten. Durch computerunterstützte Sequenzvergleiche sollte untersucht werden, ob auch im Pol-Protein der Hepadnaviren eine RNaseH-Aktivität kodiert sein könnte, deren Existenz aufgrund des Replikationsmechanismus gefordert werden muß.

Die Expression viraler Antigene während einer Infektion führt bei vielen Antigenen zur Aktivierung des Immunsystems und zur Ausbildung von Antikörpern. Der Nachweis solcher Antikörper, die gegen Sequenzen des Pol-Proteins gerichtet sind, wären ein indirekter Hinweis auf die Expression dieses Leserasters *in vivo*. Mithilfe *in vitro* synthetisierter Teile des Pol-Proteins sollten solche Antikörper und gegebenenfalls der Zeitpunkt ihres Auftretens nachgewiesen sowie deren Bindungsstellen eingegrenzt werden.

Ein direkter Beweis für die funktionelle Bedeutung der von Toh et al. (1983; 1985) beschriebenen Homologieregion des HBV Pol-Proteins zu reversen Transkriptasen von Retroviren sollte mithilfe der aktivierten Gelanalyse erhalten werden. Dabei baut ein Enzym nach gelelektrophoretischer Auftrennung radioaktiv markierte Vorläufer in ein in der Gelmatrix enthaltenes Substrat ein; die Lokalisation des aktiven Proteins wird dann indirekt durch Autoradiographie der umgesetzten Reaktionsprodukte sichtbar gemacht.

2.1. Ein ribosomaler Rasterwechsel führt zur Synthese von C/Pol-Proteinen in vitro

"Es ist eine gute Regel, in Ergebnisse, die durch Beobachtung erhalten werden, nicht allzuviel Vertrauen zu setzen, bevor sie nicht durch die Theorie bestätigt werden."

Sir Arthur Eddington, 1934

2.1.1. Theoretische Überlegungen zum Rasterwechsel

Trifonov beschrieb 1987 zusätzlich zum Tripletcode einen zweiten Code auf der mRNA. Er soll für das Einhalten des korrekten Leserasters während der Translation verantwortlich sein und besteht aus einem periodischen Drei-Basenpaar-Muster ($G \cdot \text{Nicht-G} \cdot N$), mit einer starken Präferenz für Guanin in der ersten sowie dem Fehlen von Guanin in der zweiten Position der Triplets einer kodierenden Sequenz. Untersucht wurden 130 verschiedene Spezies mit 1030 mRNA-Sequenzen von Tieren, Pflanzen, Bakterien, Viren, Organellen, Plasmiden und Transposons. Die Periodizität ($G \cdot \text{Nicht-G} \cdot N$)_n erscheint sofort nach dem Initiationskodon und wird bis zum Terminationskodon aufrecht erhalten, wo sie abrupt abbricht. An Stellen, an denen Ribosomen während der Translation das Leseraster wechseln, findet man das G-periodische Muster unterbrochen; es erscheint wieder in dem neuen zur Translation benutzten Raster. Als Maß für die G-Periodizität wurde die Differenz zwischen der Anzahl der Guanine an erster Position der Triplets (GI) und der an zweiter Stelle (GII) benutzt, gemittelt über 20 Kodons (60 Basen) und bezogen auf das aktuelle Leseraster. In 96% der untersuchten Fälle ist $GI-GII > 0$ für ein zur Translation benutztes Raster. Abb.2.1.1.a zeigt graphisch eines der von Trifonov beschriebenen Beispiele für den Wechsel des G-Musters bei dem gut untersuchten ribosomalen Rasterwechsel des Hefe Transposons Ty1. Der Rasterwechsel von TyA nach TyB wurde experimentell auf den schraffierten Bereich festgelegt (Clare et al., 1988); an dieser Stelle wird $GI-GII$ des TyA-Rasters ≤ 0 , während der Wert für TyB positiv wird. Wendet man nun dieses Verfahren auf HBV an, und zwar auf die gesamte C- und die ersten 500 Basenpaare der Pol-Region, so werden die kodierenden Kapazitäten der Raster bestätigt. Allerdings wird die Situation im C/Pol-Überlappbereich, der für die Vorhersage eines Rasterwechsels interessant ist, durch den Argininreichen Carboxyterminus von HBcAg verfälscht. Alle Kodons für Arginin enthalten als zweites Nukleotid ein G, wodurch sich zwangsläufig ein negativer Wert $GI-GII$ für C, und ein positiver Wert für Pol (Pol ist im +1-Raster!) ergibt. Interessanterweise steigt der Wert $GI-GII$ für das Pol-Raster schon vor der für die Arginin-reiche Region kodierenden Sequenz deutlich ins Positive.

Das läßt vermuten, daß entweder ein ribosomaler Rasterwechsel am 5'-Ende des Pol-Leserasters stattfindet, die Translation am Pol-AUG bei Pos.407 initiiert oder gar die geänderte Periodizität (G Nicht-G · N)_n im Arginin-reichen Carboxyterminus von HBcAg ausreicht, einen Rasterwechsel zu induzieren.

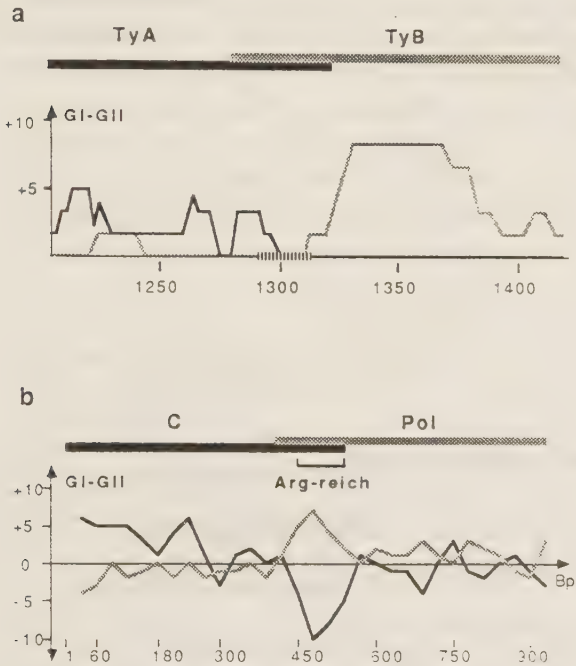


Abb.2.1.1. a) Darstellung der G-Periodizität und des Übergangs zweier Leseraster am Beispiel der Gene TyA und TyB des Hefetransposons Ty1. Der Ort des +1-Rasterwechsels ist schraffiert (modifiziert nach Trifonov, 1987). b) Berechnung der G-Periodizität für das C-Gen und das 5'-Ende des Pol-Leserasters. Arg-reich = das an Arginin-Kodons reiche 3'-Ende des C-Gens; GI-GII = Differenz der Anzahl Guanine in Position I und II der Triplets eines Leserasters, gemittelt über 20 Kodons.

Für die ribosomalen Rasterwechsel bei der Synthese der retroviralen gag/pol-Vorläufermoleküle wurden bestimmte Nukleotidsequenzen und Sekundärstrukturen der mRNA als Signale für die

Ribosomen vorgeschlagen und zum Teil experimentell nachgewiesen. So wurde durch Punktmutationen des gag/pol-Überlapps von HIV-1 die Sequenz UUUUA als essentiell für den Rasterwechsel festgelegt (Jacks et al., 1988). Die Vorstellung ist, daß die Ribosomen von UUA (gag) um ein Nukleotid auf UUU (pol) 'zurückrutschen' und dadurch den Rasterwechsel bewerkstelligen. Als Signal dafür wird eine als 'Bäumchenstruktur' bezeichnete Sekundärstruktur der mRNA angenommen, die die Ribosomen auflaufen lassen und das Zurückrutschen begünstigen soll (Jacks et al., 1988a). Mithilfe des Programms STEMLoop (UWGCG Software, Vax-Computer) konnten solche Strukturen auch für den C/Pol-Überlapp vorhergesagt werden, Abb.2.1.2 zeigt ein Beispiel aus dem 5'-Ende des Überlappbereichs.

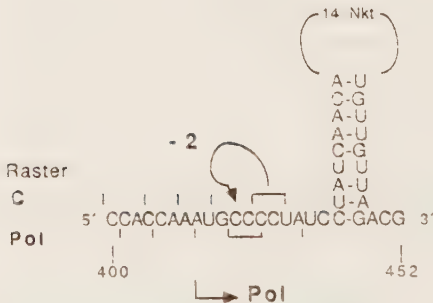


Abb.2.1.2. Strukturvorhersage für die C-mRNA im C/Pol-Überlappbereich. Ein Rasterwechsel wäre möglich durch Zurückspringen der Prolin-tRNA um zwei Nukleotide von CCU auf CCC (Pfeil) unter Beibehaltung einer Zwei-Nukleotid-Basenpaarung zwischen Kodon und Antikodon.

Da die bisher charakterisierten retroviralen Rasterwechsel -1 sind, d.h. die Ribosomen um ein Nukleotid nach hinten rutschen, das Pol-Raster in HBV aber einen Wechsel nach +1 erfordert und über den Mechanismus solcher Wechsel in Eukaryonten noch nichts bekannt ist, bleibt der Zusammenhang derartiger Strukturvorhersagen mit dem Auftreten eines ribosomalen Rasterwechsels reine Spekulation. Auch die Art und Weise des Rasterwechsels ist völlig offen; er könnte +1 durch Vorrutschen der Ribosomen um ein Nukleotid, -2 durch Zurückrutschen um zwei Nukleotide wie in Abb.2.1.2 vorgeschlagen, oder gar zweimal -1 unter Benutzung des dritten Leserasters erfolgen. Für Prokaryonten wurde eine Reihe verschiedener Rasterwechsel beschrieben, neben dem 'einfachen' Vor- oder Zurückrutschen um ein oder zwei Nukleotide auch ein Überspringen mehrerer Nukleotide durch tRNAs (Weiss et al., 1987).

2.1.2. Konstruktion der Plasmide zur in vitro Transkription

Zum Nachweis einer C/Pol-Fusion auf Translationsebene wurden zunächst geeignete Plasmide benötigt, um mRNAs zur Translation in vitro herzustellen. Dazu wurde das von Melton et al. (1984) beschriebene SP6-System verwendet. Es beruht auf der spezifischen RNA-Synthese durch die RNA-Polymerase des Bakteriophagen SP6, die die Transkription von Plasmiden ausschließlich am darauf enthaltenen SP6-Promoter initiiert. Transkripte, die auf Initiation an anderen pro- oder eukaryontischen Promotoren zurückzuführen sind, oder Transkripte des nichtkodierenden Strangs, wurden sehr selten ($<0.2\%$) beobachtet. Die Transkription findet auf linearisierten Plasmiden statt, da keine Terminationssignale für die SP6-Polymerase bekannt sind. Das 3'-Ende der RNAs ist somit durch den Ort der Linearisierung festgelegt, die Polymerase fällt an dieser Stelle von ihrer Matrize ab. Nachfolgend sind Plasmide beschrieben, die im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellt wurden und als Ausgangspunkt für die ersten Experimente dienten.

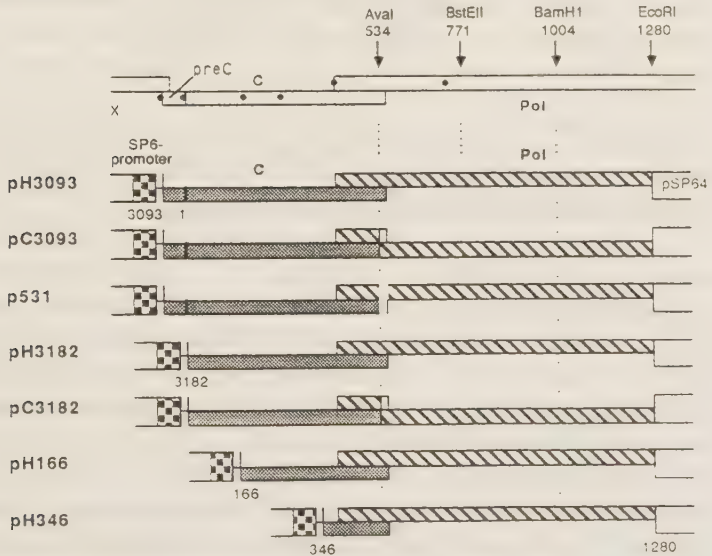


Abb.2.1.3. Ausschnitt aus dem HBV-Genom und Plasmide zur in vitro Transkription. Die Plasmide sind bezeichnet nach dem ersten Nukleotid der HBV-Sequenz 3' des SP6 Promoters. Die zur Klonierung oder Linearisierung verwendeten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind mit ihrer Position angegeben. ● = ATG

Sie bestehen aus 3 Subklonten (Mellon et al., 1984), in die verschiedene HBV-Subfragmente inkloniert wurden. Diese klonen alle an der EcoRI-Stelle bei Pos.1280 (Nomenklatur Pasek et al., 1979), die 5'-Enden bei Pos. 3093 (vor preC-ATG), 3182 (vor C-ATG), 166 und 346 (vor Pol-ATG) lokalisiert (Abb.2.1.3.). Die Translationsprodukte sind precore für pH3093, HBcAg für pH3182, aminoterminal verkürztes HBcAg ab AUG Pos.196 für pH166 und Pol für pH346. Durch die unterschiedlichen 5'-Enden soll der Einfluß möglicher Sekundärstrukturen der 5'-Region auf einen Rasterwechsel untersucht werden.

Um einen Größenmarker für C/Pol-Fusionsproteine zu haben, die durch ribosomalen Rasterwechsel entstehen könnten, sollten durch Deletionsmutagenese C/Pol-Fusionsgene geschaffen werden. Dazu wurden pH3093 und pH3182 mit Aval am Ende des C-Gens linearisiert, die überhängenden Enden mit S1-Nuklease abverdaut, und die Plasmide religiert. Die Deletion der 4 Nukleotide führte zur Fusion des Pol- an das C-Leseraster. Die Überprüfung durch Sequenzanalyse ergab neben den erwarteten Klonen pC3093 und pC3182 (Abb.2.1.3) ein aus p531 bezeichnetes Konstrukt, dem 15 Nukleotide von Pos. 531-545 fehlen; das Stopkodon wurde dabei erhalten. Die Translation dieser RNA sollte zu einem um 0,5Kd carboxyterminal verkürzten Proteine führen und stellt eine wertvolle Deletionsmutante zur Untersuchung eines Rasterwechsels dar, da die meisten der beschriebenen Rasterwechsel unmittelbar vor bzw. am Start von des ersten Leserasters stattfinden.

2.1.3. Die Translationsprodukte des Pol-Rasters sind mit RNA assoziiert

Zunächst wurden die RNAs von pH3182 und pC3182 translatiert, um erste Anhaltspunkte für einen möglichen Rasterwechsel während der Translation zu erhalten. C/Pol-Fusionsproteine sollten mit dem korrespondierenden Translationsprodukt von pC3182 komigrieren. Die beiden Plasmide wurden mit BstEII, BamH1 und EcoRI linearisiert (Abb.2.1.3.), in vitro transkribiert und in Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert. Abb.2.1.4. zeigt das Autoradiogramm des Proteingels. Die Translation von pH3182 ergibt als dominantes Protein bei der RNA jeder Linearisierung wie erwartet das 21,5Kd HBcAg (Protein a). Die errechneten Molekulargewichte der C/Pol-Proteine von pC3182 sollten 26200 (für die RNA bis BstEII), 34400 (BamH1) und 48500 (EcoRI) betragen. Proteine mit diesen Molekulargewichten können auch in der jeweiligen Spur erkannt werden (b, c und d), aber zusätzlich tauchen um ca. 20Kd größere Proteine auf (b', c' und d'). Diese können nur durch Modifikation von b, c und d entstanden sein, weil die kodierende Kapazität der jeweiligen RNAs keine größeren Proteine zuläßt. Die Translation von pH3182/EcoRI läßt bereits bei 48Kd eine schwache Bande (►) der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie das C/Pol-Protein aus pC3182 erkennen; dies war der erste experimentelle Hinweis für das Auftreten eines Rasterwechsels. Die C/Pol-Proteine laufen als Doppelbande mit etwa 6Kd Differenz; das kleinere ist, wie un-

ten gezeigt werden wird, auf interne Initiation der Translation am C-AUG bei Pos.196 zurückzuführen.

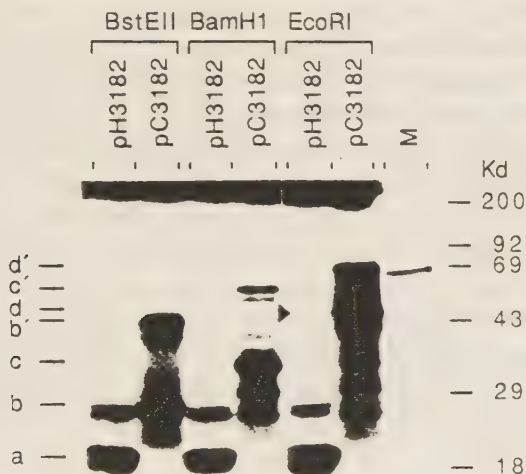


Abb.2.1.4. In vitro Translation von mRNAs mit unterschiedlichen 3'-Enden, die durch in vitro Transkription BstEII-, BamHI- und EcoRI-linearisierter Plasmide entstanden waren. Je 4µl der Translationsansätze wurden in 10µl SDS-Probenpuffer aufgekocht und auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm des getrockneten Gels. M = Proteingrößenstandard; Kd = Kilodalton; a = HBcAg; b-d = C/Pol-Proteine, b'-d' = modifizierte C/Pol-Proteine.

Bevor aber der Rasterwechsel genauer analysiert werden konnte, mußte die Modifikation der C/Pol-Proteine geklärt und zu umgehen versucht werden. Aufgrund der definierten Größenveränderung der Proteine a'-d' kamen nur Nukleinsäuren oder Glykane in Frage. Daher wurde die RNA pC3182/BstEII in Retikulozytenlysat translatiert und je 1.5µl Lysat mit 23 Einheiten DNaseI, 10µg RNaseA, 0.05 Einheiten Endoglykosidase F oder TE-Puffer als Kontrolle in einem Gesamtvolumen von 10µl eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wie in Abb.2.1.5.a zu sehen, ist die Modifikation der C/Pol-Proteine nicht auf Glykosylierung zurückzuführen, da Glykosidase-Behandlung keinen Einfluß auf das Protein a' hat. Dagegen führt ein RNaseA-Verdau zum völligen Verschwinden von a', gleichzeitig wird die Bande a entsprechend stärker. DNaseI-Behandlung führt -vermutlich durch eine als Kontamination in der Enzympräparation enthaltene Protease- zur Degradation aller Proteine. Da durch Zugabe eines Proteasehemmers die Wirkung der proteolytischen Kontamination unterbunden werden kann und die DNaseI keine Änderung des Proteinmusters bewirkt (Abb.2.1.5.a), kann eine DNA als

Modifikation ausgeschlossen werden. Als Proteasehemmer fanden Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Konzentration $75\mu\text{M}$), Pepstatin (Pep; $300\mu\text{M}$) und α_2 -Makroglobulin (MG; $75\mu\text{g/ml}$) Verwendung. PMSF und Pepstatin inhibierten nur zu einem geringen Prozentsatz, während α_2 -Makroglobulin die Prozessierung der Proteine vollständig unterband.

Als Bestätigung, daß der Größenunterschied wirklich durch eine RNA, und nicht durch eine DNA hervorgerufen wird, wurden die Proteine b und b' von pC3182/BamH1 einer NaOH- und HCl-Behandlung ausgesetzt. RNA ist säurestabil, wird aber in Gegenwart der Lauge degradiert, DNA ist gegen beide Agenzien stabil. $1.5\mu\text{l}$ Lysat wurden in 0.1M und 0.05M NaOH oder HCl für 10min. bei Raumtemperatur und 60°C inkubiert und vor Zugabe des Probenpuffers mit 0.2M NaH_2PO_4 , pH 7.5, neutralisiert. Die Gelanalyse in Abb.2.1.5.b zeigte, daß die Modifikation säurestabil, aber laugenlabil war. Damit waren die vorangegangenen Ergebnisse bestätigt, daß RNA das modifizierende Agens darstellte. Diese schien kovalent an die C/Pol-Proteine gebunden zu sein, da sie selbst durch längeres Kochen in Probenpuffer nicht abzutrennen war. Der definierte Größenunterschied im Laufverhalten wies auf ein homogene Spezies an RNA hin; dafür kommen die zur Translation eingesetzte mRNA, ribosomale RNA oder tRNA in Frage.

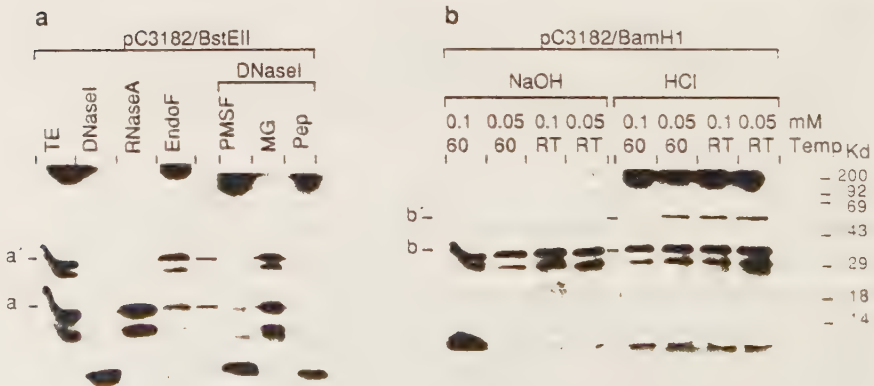


Abb.2.1.5. Modifikation von C/Pol-Proteinen. a) Behandlung von Translationsansätzen mit verschiedenen Enzymen (Kontrolle ist Inkubation in TE-Puffer, TE) und Inhibition der Proteasekontamination in der DNaseI-Präparation. Aliquots der Translationsansätze wurden wie im Text beschrieben inkubiert und auf 17.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Abgebildet sind jeweils die Autoradiogramme der getrockneten Gele. EndoF=Endoglykosidase F; PMSF=Phenylmethylsulfonylfluorid; MG= α_2 -Makroglobulin; Pep=Pepstatin; a=unmodifiziertes, a'=modifiziertes C/Pol-Protein. b) Säure- und Laugenbehandlung von C/Pol-Proteinen. mM=millimolar; Temp=Temperatur [$^\circ\text{C}$]; RT=Raumtemperatur; b=unmodifiziertes, b'=modifiziertes C/Pol-Protein.

40-50% der Proteine, die in vitro von mRNAs ohne Stopkodon translatiert werden, d.h. von RNAs, die von vor dem Stopkodon des betreffenden Gens linearisierter Plasmid-DNA transkribiert wurden, werden als Peptidyl-tRNA freigesetzt (Hauptle et al., 1986). Diese Peptidyl-tRNA besteht aus der Polypeptidkette mit einer Esterbindung zwischen der letzten Aminosäure und der dazugehörigen tRNA. Die Spaltung dieser Bindung erfolgt normalerweise sofort nach der Freisetzung durch im Translationssystem vorhandene Hydrolasen. Den Nachweis, daß in unserem Fall die modifizierende RNA eine nicht abgespaltene tRNA ist -ein experimenteller Hinweis darauf ist die homogene Größe dieser RNA, die eine definierte Veränderung der elektrophoretischen Mobilität verursacht-, sollte das nächste Experiment führen.

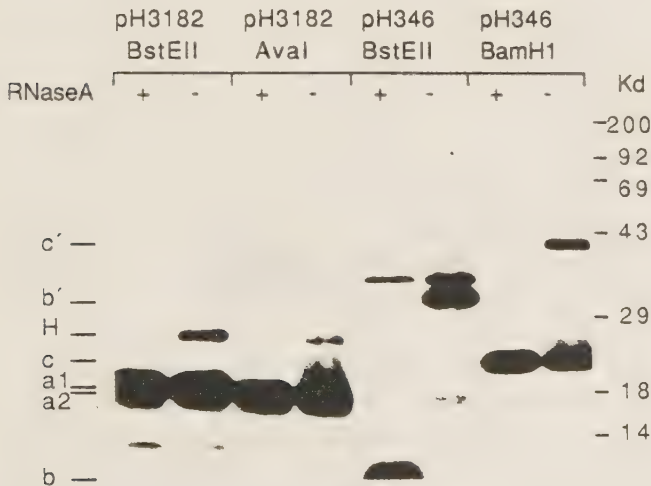


Abb.2.1.6. In vitro Translation von C- und Pol-Molekülen. Die Translationsansätze wurden vor (-) und nach RNaseA-Behandlung (+) auf einem 17.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm des getrockneten Gels. M = Proteingrößenstandard; Kd = Kilodalton.

pH3182 wurde mit BstEII und Aval (vgl. Abb.2.1.3.) linearisiert und transkribiert. Die RNA von pH3182/Aval enthält das Stopkodon des C-Gens nicht mehr; dieses carboxyterminal verkürzte HBcAg sollte teilweise als Peptidyl-tRNA vorliegen, wenn die Annahme richtig ist, daß die

Hydrolyse der Esterbindung zwischen tRNA und Polypeptidkette ineffizient ist. Die Translation auf pH3182/BstEII sollte einen normalen Terminationsprozeß am Stopkodon bei Pos.549 durchlaufen, das Protein dürfte also nicht als Peptidyl-tRNA auftreten. Gleichzeitig wurden reine Pol-Proteine durch Translation von pH346/BstEII und pH346/BamH1 erzeugt. Das Autoradiogramm in Abb.2.1.6. zeigt die Translationsprodukte vor und nach RNaseA-Verdau. Überraschenderweise liegen nur Pol-Proteine RNA-assoziiert vor (b' und c'), die C-Genprodukte dagegen, vollständig (a1) oder carboxyterminal verkürzt (a2), sind RNA-frei. Die mit H bezeichnete Bande stellt eine Hintergrundbande dar, die bei allen Translationen mehr oder weniger stark in Erscheinung tritt und durch RNaseA-Verdau verschwindet.

Die ausschließliche RNA-Assoziation von Pol- und C/Pol-Proteinen stellt die Peptidyl-tRNA Hypothese in Frage. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen waren: a) eine ungewöhnliche Faltung des Pol-Anteils, die die tRNA für Hydrolasen unzugänglich macht -allerdings ist sie RNaseA-sensitiv-, b) der bisher exprimierte Pol-Teil ist das oder ein Teil des genomgebundenen Proteins und besitzt daher eine hohe Affinität für RNA.

Aufschluß über die erste Möglichkeit sollte die Translation zweier ähnlicher Konstruktionen ergeben, auf der die Ribosomen einmal an einem durch Linearisierung der Plasmid-DNA geschaffenen 3'-Ende und im zweiten Fall an einem Stopkodon terminieren. Dazu wurde das Plasmid pC3182M (ein Derivat von pC3182, s.u.) mit BstEII bei Pos.771 linearisiert, die überhängenden Enden mit S1-Nuklease geglättet und religiert. Es entstand die Deletionsmutante pCMB, in der das Pol-Raster mit dem S-Raster fusioniert ist, 55 Nukleotide nach der deletierten BstEII-Schnittstelle befindet sich nun im Pol-Raster ein Stopkodon (Abb.2.1.7.a).

Diese Mutante wurde mit BamH1 linearisiert, korrespondierend dazu pC3182M mit BstEII; die entstehenden Proteine unterscheiden sich am Carboxyterminus um 18 Aminosäuren, d.h. 2Kd. Das Autoradiogramm der in vitro Translation vor und nach RNaseA-Verdau (Abb.2.1.7.b) zeigte RNA-Assoziation (R) nur bei pC3182/BstEII, wo die Ribosomen am 3'-Ende der RNA terminierten, das durch Restriktion der Plasmid-DNA geschaffen worden war; Termination der Translation durch ein Stopkodon bei pCMB/BamH1 führte zum völligen Verschwinden des RNA-assoziierten Proteins. Somit war eine tRNA, kovalent gebunden an die Polypeptidkette, für die Größenveränderung der Pol- und C/Pol-Proteine verantwortlich. Für alle folgenden Experimente wurden daher die Proben nach der Translation bzw. Immunpräzipitation eine Stunde mit 1mg/ml RNaseA bei 37°C inkubiert und vor dem Gelauftrag nochmals kurz aufgekocht.

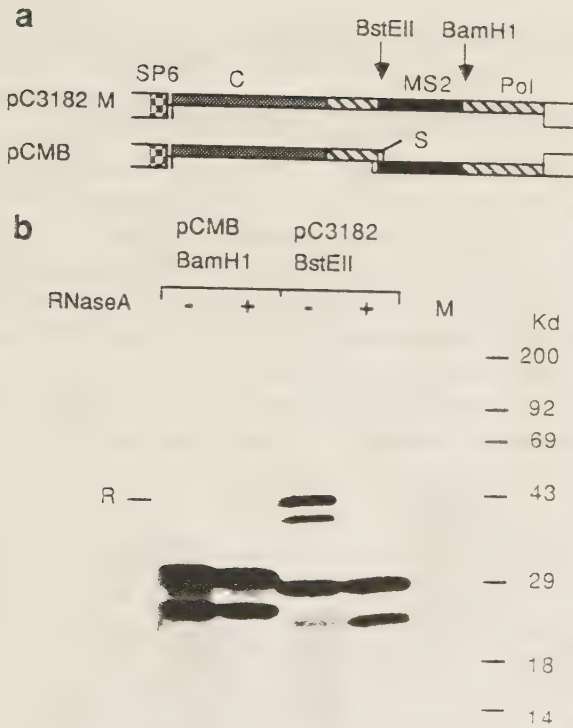


Abb.2.1.7. a) Konstruktion der Deletionsmutante pCMB aus pC3182M durch Deletion der BstEII-Schnittstelle. Dadurch wurde das Pol-Raster unterbrochen, die Translation einer pCMB-RNA terminiert an einem Stopkodon im S-Leseraster. b) pC3182M/BstEII und pCMB/BamH1 wurden in Retikulozytenlysat translatiert und vor (-) und nach (+) RNaseA-Verdau auf einem 17,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm des getrockneten Gels. R = RNA-assoziiertes C/Pol-Protein.

2.1.4. Nachweis eines ribosomalen Rasterwechsels

Drei Kriterien müssen für den Nachweis eines Leserasterwechsels auf Translationsebene erfüllt werden: 1. C/Pol-Fusionsproteine müssen die Größe der entsprechenden Kontrollproteine haben, 2. die Größe der C/Pol-Proteine muß sich bei unterschiedlicher Linearisierung der Plasmid-DNA entsprechend ändern und 3. Fusionsproteine müssen mit anti-C- und anti-Pol-Antisera reagieren. Letzteres konnte mit zur Verfügung stehenden Antisera nur teilweise überprüft werden. Zur Immunpräzipitation von C-Genprodukten war ein hochtitriges Kaninchenserum vorhanden, das gegen ein β -Laktamase-HBcAg-Fusionsprotein (Stahl et al., 1982) erzeugt worden war. Ein gegen die Aminosäuren 29-199 des Pol-Rasters (exprimiert als carboxyterminale Fusion mit den ersten 99 Aminosäuren der MS2-Replikase) gerichtetes Antiserum konnte keines der in vitro synthetisierten Pol-Proteine immunpräzipitieren. Deshalb mußte ein Reportergen in die Region 3' des C/Pol-Überlapps in das Pol-Leseraster inseriert werden, um Pol-Polypeptide nachweisen zu können. Das MS2-Replikasegen bot sich aus zweierlei Gründen dafür an. Erstens waren hochtitrige Antisera dagegen verfügbar, zweitens konnte ein Teil dieses Gens aus einem der pEx-Vektoren (siehe Anhang) so in das Pol-Raster umkloniert werden, daß es dieses nicht unterbrach. Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abb.2.1.8. gezeigt.

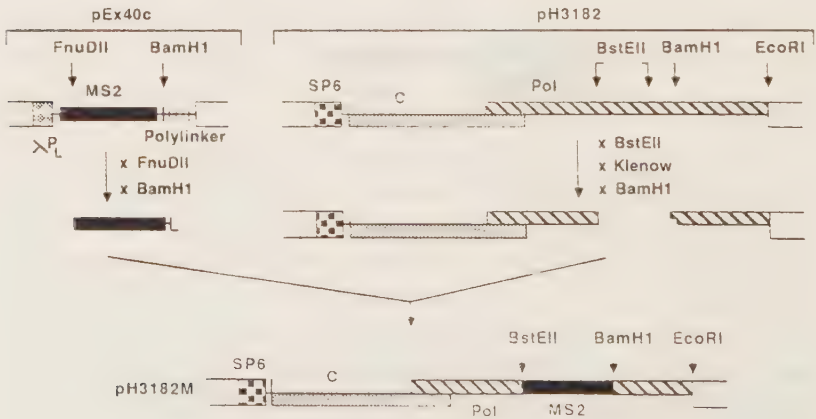


Abb.2.1.8. Konstruktion von pH3182M aus pH3182. Das FnuDII/BamHI-Fragment aus pEx40c wurde isoliert und in BstEII/BamHI-geschnittenen pH3182 inseriert; der BstEII-Schnitt war zuvor mit Klenow-Enzym aufgefüllt worden. λP_L = 'leftward' Promoter des Bakteriophagen Lambda; SP6 = SP6 Promotor

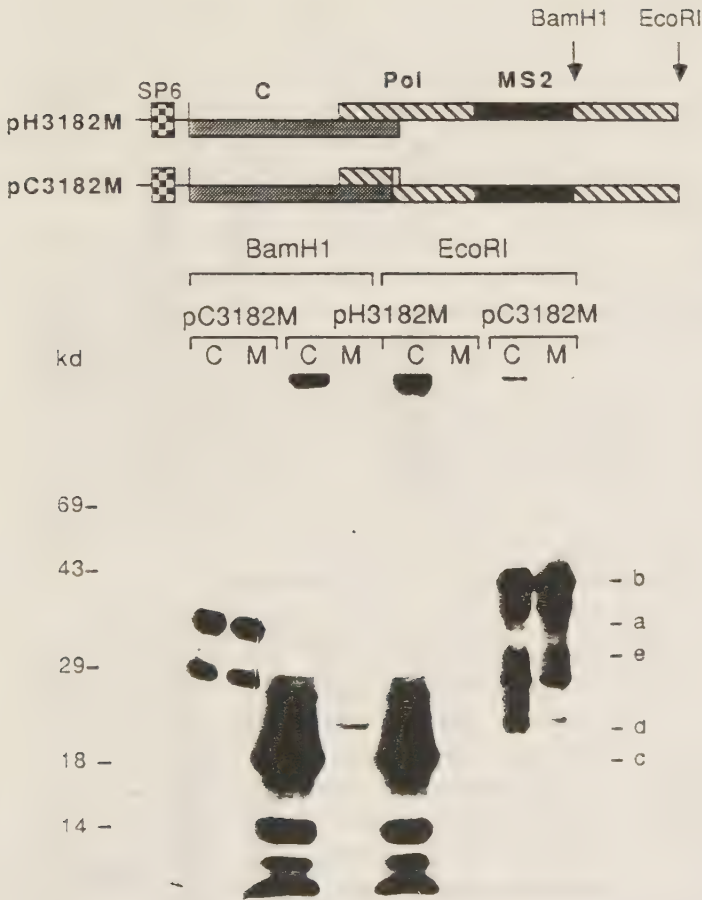


Abb.2.1.9. Nachweis von C/Pol-Fusionsproteinen. Die mit BamHI und EcoRI linearisierten Plasmide pH3182M und pC3182M wurden *in vitro* transkribiert, die RNAs in Retikulozyten-lysat translatiert und die Proteine mit C- und MS2-spezifischen Antikörpern immun-präzipitiert. Die eluierten Proteine wurden dann auf einem 17.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Salicylatbehandlung und Trocknung des Gels autoradiographiert. BamHI, EcoRI = zur Linearisierung der Plasmid-DNA verwendete Restriktionsschnittstellen; C, M = Immunpräzipitation mit α HBc- (C) und α MS2- (M) Antiserum; SP6 = SP6-Promoter; c = HBcAg; a, b = C/Pol-, d, e = Pol-Proteine.

Das FnuDII/BamH1-Fragment aus pEx40c wurde aus einem präparativen Agarosegel gereinigt und in BstEII/BamH1 geschnittene pH3182 und pC3182, deren BstEII-Schnitte mit Klenow-Enzym aufgefüllt worden waren, einkloniert. Die Einhaltung des Leserasters wurde restriktionsanalytisch mit BamH1 und BstEII sowie durch Sequenzanalyse überprüft. Die neuen Plasmide wurden pH3182M und pC3182M benannt. Sie wurden mit BamH1 und EcoRI linearisiert, transkribiert, die RNAs translatiert und das Lysat einer Immunpräzipitation mit α C- und α MS2-Antikörpern unterworfen. Das Autoradiogramm des Proteingels ist in Abb.2.1.9. abgebildet.

Die beiden linken und rechten Spuren sind die Kontrollproteine (a und b), links war die Plasmid-DNA mit BamH1, rechts mit EcoRI linearisiert worden. Die Proteine der jeweils linken Spur sind mit α C- (C), die der rechten Spur mit α MS2- (M) Antikörpern immunpräzipitiert. Beide Antikörper präzipitierten in etwa äquivalente Mengen Antigen. In der Mitte ist pH3182M in der gleichen Weise aufgetragen. Neben HBcAg (c), dem Haupttranslationsprodukt, waren Proteine zu erkennen, die 1. die gleiche elektrophoretische Mobilität besaßen wie die Kontrollproteine a und b, 2. deren Mobilität sich entsprechend der Linearisierung der Plasmid-DNA änderte und die 3. mit beiden Antisera reagierte. Somit handelte es sich hier um C/Pol-Fusionsproteine, die durch Rasterwechsel der Ribosomen während der Translation entstanden sein konnten. Die nur mit α MS2-Antikörpern reagierenden Polypeptide d und e sind auf interne Initiation der Translation am Pol-AUG bei Pos.407 zurückzuführen, wie im folgenden nachgewiesen werden wird.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde nun derselbe Teil des MS2-Replikasegens in das Pol-Raster der übrigen in Abb.2.1.3. gezeigten Plasmide pH3093, pC3093, p531, pH166 und pH346 wie oben und in Abb.2.1.8. beschrieben, an analoger Stelle einkloniert. Linearisierung der Plasmide mit BamH1 und EcoRI, in vitro Transkription und Translation sowie Immunpräzipitation mit α C- und α MS2-Antikörpern und die Gelelektrophorese der eluierten Proteine führte zu den in Abb.2.1.10. gezeigten Autoradiogrammen (2.1.10.a, BamH1-, 2.1.10.b EcoRI-linearisierte Plasmid-DNA; die jeweiligen Bezeichnungen der Proteine entsprechen sich). Die Translation von pC3093M ergab als dominantes Protein das Kontrollprotein preC/Pol (d), zu einem geringen Teil durch interne Initiation der Translation an den AUGs bei Pos.1 und 196 auch C/Pol (e) und aminoterminal verkürztes C/Pol (f), was durch Vergleich mit den entsprechenden Translationen von pC3182M und pH166M festzustellen ist. Das Hauptprodukt von pH3093M und p531M ist precore (a) bzw. carboxyterminal verkürztes precore (a'), außerdem ist bei beiden ein preC/Pol-Fusionsprotein (d), zu einem geringen Teil -durch interne Initiation der Translation entstanden- auch C/Pol (e) und Pol (c) nachweisbar. Das bedeutet, daß der Rasterwechsel nicht am Ende des C-Gens, zwischen Pos.531 und 545, stattfindet.

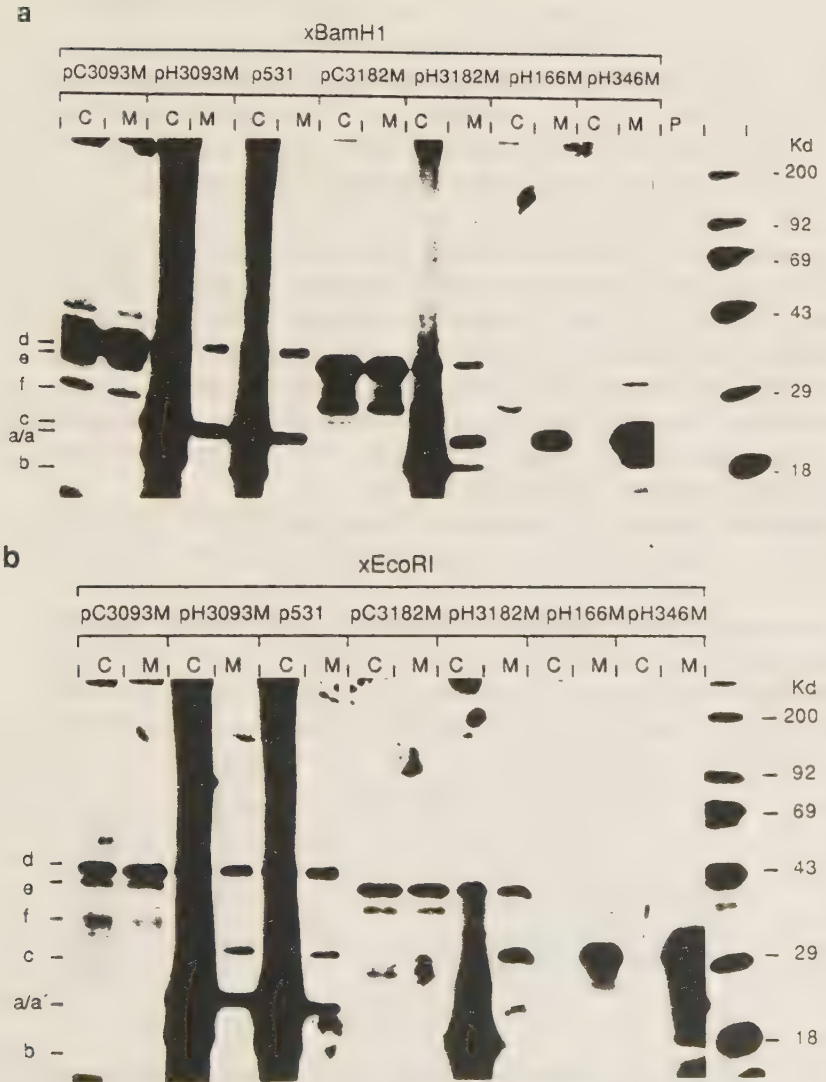


Abb.2.1.10. Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter, immunpräzipitierter C-, C/Pol-, und Pol-Proteine. 17.5%iges SDS-Polyacrylamidgel; die Immunpräzipitation erfolgte mit α Hbc- (C), α MS2- (M), und Präimmunserum (P). Die Plasmid-DNA war mit BamH1 (a) und EcoRI (b) linearisiert worden.

Der Vergleich der nur mit α MS2-Antikörpern reagierenden Proteine bei pH3093M, pH3182M und pH166M (c) mit dem Pol-Protein, das durch Translation von pH346M entsteht, bestätigt deren Entstehung durch interne Initiation der Translation am Pol-AUG bei Pos.407. Der Rasterwechsel wird offensichtlich nicht von den ersten 160 Nukleotiden des C-Gens beeinflusst, da auch pH166M ein C/Pol-Fusionsprotein (f) zeigt; das aminoterminal verkürzte HBcAg dieser Translation ist auf den abgebildeten Gelen aufgrund seiner geringen Größe leider nicht mehr zu sehen.

Die Spezifität der Immunreaktionen wurde überprüft, indem ein vor der Immunisierung mit MS2-Antigen abgenommenes Serum (Präimmunserum) zur Präzipitation von pH346M/BamH1 verwendet wurde (Abb.2.1.10.a, Spur P); wie erwartet ist keine Schwärzung des Films festzustellen. Probleme bei Immunfällungsreaktionen tauchten nur in Zusammenhang mit C-Genprodukten auf, die einerseits mit Pol-Proteinen interagierten und mit diesen kopräzipitierten (vgl. 2.1.10.b, pH3093M und p531M/ α MS2), andererseits Aggregate bildeten und teilweise über die gesamte Laufstrecke schmierten. Durch Verdoppeln der β -Mercaptoethanol- und SDS-Konzentration im Probenpuffer konnte dieses Problem teilweise gelöst werden.

Da alle weiteren Ergebnisse der Translationen mit RNA von BamH1- und EcoRI-linearisierter Plasmid-DNA vergleichbar waren, werden im folgenden nur noch letztere gezeigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß ein Rasterwechsel der Ribosomen während der Translation zur Synthese von C/Pol-Fusionsproteinen führte, die durch ihre Größe und Immunreaktion mit α C- und α MS2-Antikörpern als solche identifizierbar waren. Der Rasterwechsel benötigte nicht die Nukleotide 531-545 unmittelbar vor dem Stopkodon des C-Gens, ebenso ist dieser quantitativ unbeeinflusst von den ersten 160 Nukleotiden der C-mRNA.

2.1.5 Andere Translationssysteme: Weizenkeimextrakt und Oozyten

Wie die vorangegangenen Experimente zeigten, wird die Proteinsynthese im verwendeten Kaninchen-Retikulozytenlysat nicht nur am ersten Initiationskodon der mRNA gestartet, sondern auch intern, bis zu 500 Basen 3' des ersten AUGs. Interne Initiation ist für Eukaryonten unüblich, wenn auch Ausnahmen beschrieben sind (zur Übersicht siehe Kozak 1985). Da Ribosomen des Retikulozytensystems häufig die Proteinsynthese an in vivo nicht benutzten Initiationskodons beginnen (Kozak, 1988), sollte ein anderes in vitro Translationssystem benutzt werden, der Weizenkeimextrakt. Er soll die in-vivo-Situation exakter widerspiegeln, beispielsweise durch höhere Selektivität für in vivo benutzte Initiationskodons (Kozak, 1988). Er sollte somit Hinweise für die mögliche Benutzung interner AUGs wie auch auf das natürliche Vorkommen eines Rasterwechsels während der Translation einer C-mRNA in vivo geben.

Zur vergleichenden Translation wurde RNA von pH3182M/EcoRI verwendet; das Autoradiogramm der Immunpräzipitation ist in Abb.2.1.11. abgebildet.

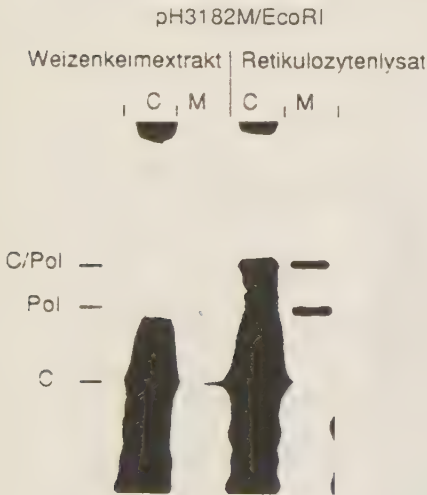


Abb.2.1.11. Vergleich zweier in vitro Translationssysteme. Die RNA pH3182M/EcoRI wurde in Weizenkeimextrakt und Retikulozytenlysat translatiert. Die Proteine wurden mit α Hbc- (C) und α MS2- (M) Antikörpern immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Translationseffizienz der beiden Lysate ist vergleichbar. Im Weizenkeimextrakt wird ebenfalls ein C/Pol-Protein synthetisiert. Zwei gravierende Unterschiede sind feststellbar: erstens ist die Effizienz des Rasterwechsels im Weizenkeimextrakt um etwa den Faktor 5 geringer als im Retikulozytenlysat; zweitens ist ein auf interne Initiation der Translation zurückzuführendes Pol-Protein erst nach wesentlich längerer Exposition des gezeigten Röntgenfilms sichtbar. Voraus-

gesetzt, der Weizenkeimextrakt besitzt wirklich eine größere Nähe zur in vivo vorgefundenen Situation, dann läßt dieses Ergebnis den Schluß zu, daß die Synthese des Pol-Proteins in vivo eher durch ribosomalen Rasterwechsel als durch interne Initiation auf der C-mRNA oder dem Pragenom zustande kommt. Nur eine in vitro möglicherweise nicht erreichte Faltung der C-mRNA oder eine bislang unentdeckte Pol-spezifische mRNA könnten für die Translation eines reinen Pol-Proteins in vivo verantwortlich zeichnen. Wegen der höheren Effizienz des Rasterwechsels wurde für die weiteren Experimente Retikulozytenlysat verwendet.

Ein weiteres eukaryontisches Translationssystem stellt die Expression von mikroinjizierter mRNA in Froschoozyten dar. Allerdings sind für die Injektion verwendbare Oozyten nur zu bestimmten Zeiten erhältlich. Das Ergebnis einer freundlicherweise von Dr. Gisela Stahnke durchgeführten Mikroinjektion der RNA pH3182M/EcoRI ist in Abb.2.1.12. zu sehen.

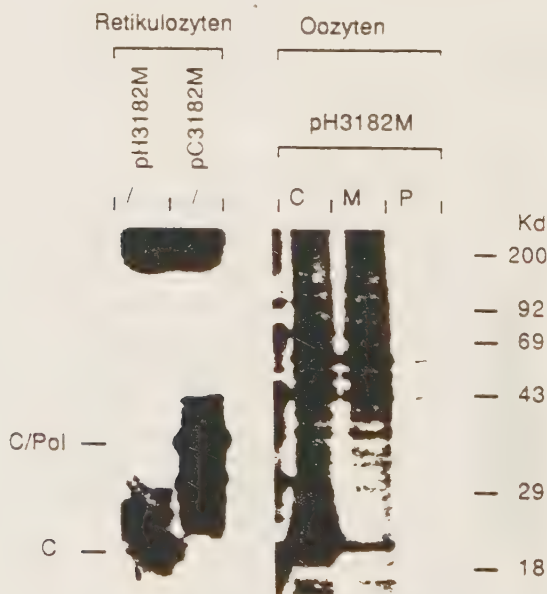


Abb.2.1.12. Expression der RNA pH3182M/EcoRI in *Xenopus*-Oozyten und Vergleich mit in vitro Translationsprodukten aus Retikulozytenlysat. Das Lysat wurde unpräzipitiert (I) auf ein 17.5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. die Proteine der Oozyten immunpräzipitiert mit α Hbc- (C), α MS2- (M) und Präimmunserum (P).

Links sind, als Kontrollen für die Größe der erwarteten Proteine, im Retikulozytenlysat translatierte pH3182M und pC3182M/EcoRI unpräzipitiert aufgetragen, rechts Immunpräzipitationen einer Oozytenexpression von pH3182M/EcoRI mit α C- (C), α MS2- (M) und Kontrollantiserum (MS2 Präimmunserum, P). Wegen der hohen Hintergrundsignale bei der Immunfällung, die auch durch stringenter Waschbedingungen (doppelt konzentrierter Waschpuffer) nicht zu eliminieren waren, vor allem aber aufgrund der Schätzung, daß die Menge an synthetisiertem HBcAg pro Oozyte etwa der entsprach, die in einem einzigen Mikroliter Retikulozytenlysat hergestellt wurde, war die Verwendung dieses Systems nicht angezeigt.

2.1.6 Deletionsmutanten zur Lokalisierung des Rasterwechsels

Verschiedene Deletionsmutanten wurden nun konstruiert, um den Ort des ribosomalen Rasterwechsels und/oder die dafür notwendigen Sequenzen einzugrenzen. Die durchgeführten Klonierungen werden im folgenden beschrieben, die daraus entstandenen Konstruktionen sind schematisch in Abb.2.1.13.a vorgestellt. Ausgangsplasmid für alle Mutanten war pH3182M.

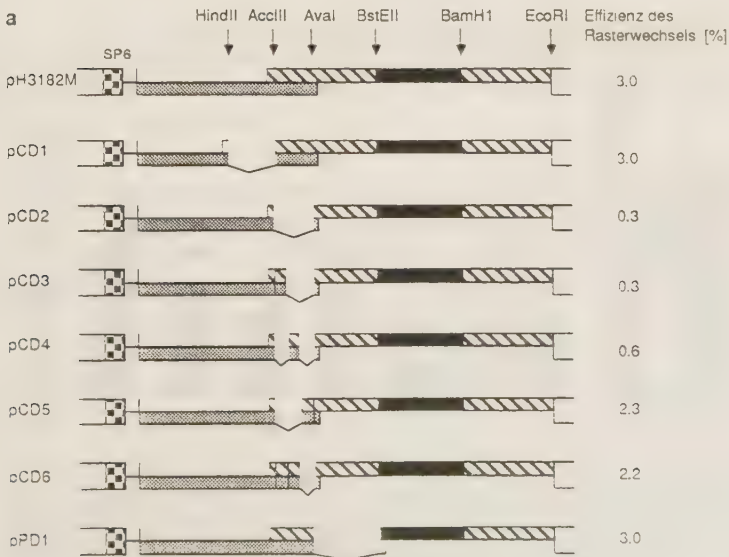


Abb.2.1.13. a) Darstellung der aus pH3182M hervorgegangenen Deletionsmutanten, die zur Klonierung und später zur Linearisierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und die Effizienz der in d) beschriebenen Rasterwechsel.

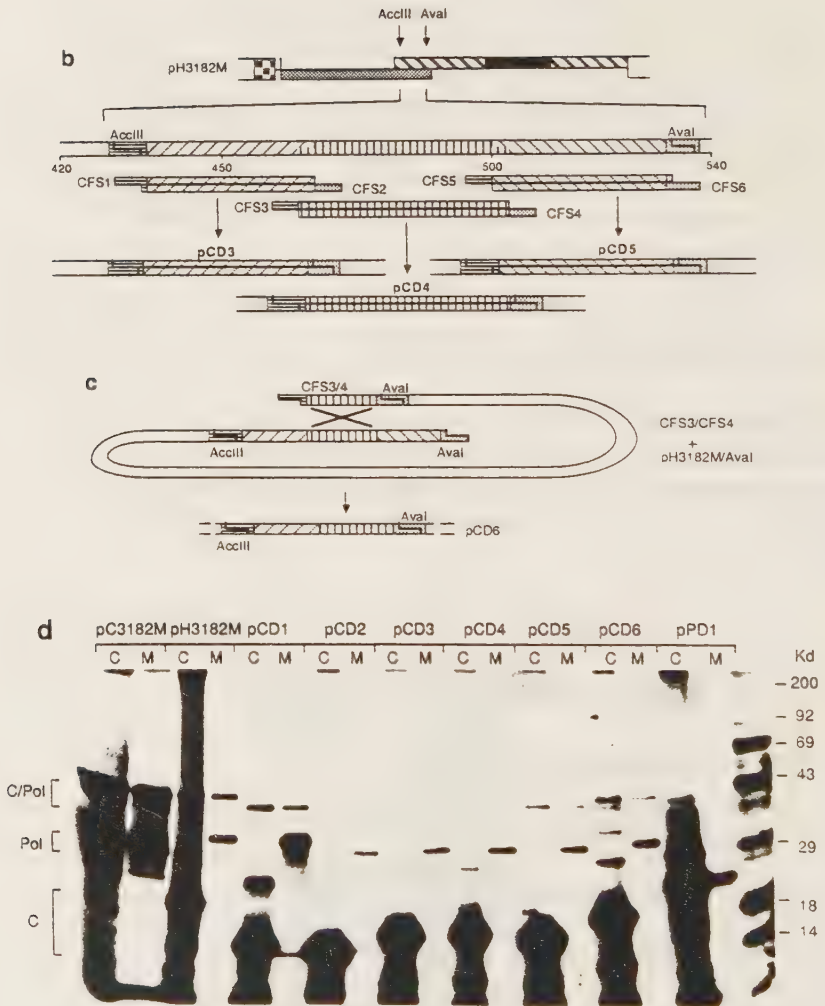


Abb.2.1.13. b) Lokalisation der zur Klonierung von pCD3, pCD4 und pCD5 verwendeten Oligonukleotidpaare im C/Pol-Überlapp und Aufbau der Mutanten. CFS1-CFS6, Bezeichnung der Oligonukleotide. c) mutmaßliche Entstehung der Mutante pCD6 durch homologe Rekombination des Oligonukleotidpaares CFS3/CFS4 mit dem Überlappbereich von Aval-linearisiertem pH3182M. d) Die in a) vorgestellten Deletionsmutanten wurden mit EcoRI linearisiert und in vitro transkribiert. Die RNAs wurden dann in Retikulozytenlysat translatiert, die Proteine mit α HbC- (C) und α MS2 (M) Antikörpern immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch (17.5% SDS-Polyacrylamidgel) aufgetrennt. Abbildung d) zeigt das Autoradiogramm des getrockneten Gels.

- pCD1: Die ersten 80 Basenpaare des C/Pol-Überlapps inklusive des Pol-ATGs (der Überlapp beginnt 57 Bp vor dem ATG) wurden durch Deletion des HindII/AccIII-Fragmentes (Pos.268-429) aus pH3182M entfernt. Die AccIII-Schnittstelle mußte mit Klenow-Enzym aufgefüllt werden, um das C-Raster zu erhalten.
- pCD2: Dieser Mutante, die durch Deletion des AccIII/AvaI-Fragmentes (Pos.430-537) und Glätten der Enden mit S1-Nuklease entstand, fehlt der Mittelteil der Überlappregion.
- pPD1: Die letzten 12 Basenpaare des Überlapps und anschließende Sequenzen, von der Aval-Schnittstelle bei Pos.538 bis zum Beginn des MS2-Teils (Pos.771) sind hier deletiert. Um das Pol-Raster zu erhalten, wurde pH3182M zuerst mit BstEII linearisiert, die überhängenden 5'-Enden mit S1-Nuklease abgedaut, dann mit AvaI nachgeschnitten und die Enden dieser Schnittstelle mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Die Translation des C-Gens terminiert nun an einem Stopkodon in der MS2-Sequenz.
- pCD3, pCD4, pCD5: Oligonukleotide (CFS1-CFS6), die Teilstücke des in pCD2 deletierten AccIII/AvaI-Fragmentes darstellen, wurden in AccIII/AvaI-geschnittenen pH3182M inseriert. Die Oligonukleotidpaare und ihre Lokalisation in der Überlappsequenz sind in Abb.2.1.13.b schematisch aufgezeigt. An die 5'-Enden von CFS3 und CFS5 wurde die Sequenz ^{5'}CCGG^{3'} angehängt, um die Oligopaare in die AccIII-Schnittstelle einsetzen zu können, analog dazu wurde für die AvaI-Stelle an das 5'-Ende von CFS2 und CFS4 die Sequenz ^{5'}AGCC^{3'} hinzugefügt.
- pCD6: Bei der Klonierung von pCD4 entstand pCD6 vermutlich durch homologe Rekombination eines nur AvaI geschnittenen pH3182M mit einem CFS3/CFS4-Oligonukleotidpaar (Abb.2.1.13.c). Dieses Plasmid enthält daher die Sequenzinformation von pCD3 plus pCD4, es fehlen, verglichen mit pH3182M, die Nukleotide 504-533.

Diese Deletionsmutanten wurden nun darauf untersucht, ob sie noch die für den ribosomalen Rasterwechsel notwendigen Sequenzinformationen besitzen. Es wurde nach dem bekannten Schema, Linearisierung mit EcoRI, Transkription, Translation, Immunpräzipitation, Gelelektrophorese und Autoradiographie verfahren, das Ergebnis ist in Abb.2.1.13.d dargestellt. Alle Deletionsmutanten unterstützten, mit unterschiedlicher Effizienz, die Entstehung von C/Pol-Fusionsproteinen. Jede der Mutanten besaß offenbar die Information oder die Struktur, die translatierenden Ribosomen zu einem gewissen Prozentsatz in ein anderes Raster zu dirigieren. Die Effizienz des Rasterwechsels wurde durch Ausschneiden der C- und C/Pol-Proteine aus dem getrockneten Gel und Messen der eingebauten Radioaktivität bestimmt. Es wurde der Prozentsatz an C/Pol-Molekülen pro C-Molekül berechnet und auf den jeweiligen Methioningehalt korrigiert (die eingebaute Radioaktivität ist ³⁵S-Methionin; die C-Proteine enthalten 3, die C/Pol-Proteine je nach Ort des Rasterwechsels 4 oder 5 Methionine). Die Effizienz des Rasterwechsels ist in Abb.2.1.13.a rechts angegeben.

Die Deletion des vorderen (pCD1) und hinteren Teils (pPD1) des C/Pol-Überlapps hatte keinen Einfluß auf die Häufigkeit des Rasterwechsels, wichtige Strukturen dafür scheinen hier nicht lokalisiert zu sein. Ohne den Mittelteil des Überlapps (CD2) reduziert sich das Ereignis um eine Größenordnung, wird aber nicht völlig unterdrückt. Das Einfügen von CFS1/CFS2 in pCD3 bewirkt keine, das von CFS3/CFS4 in pCD4 nur eine äußerst geringe Zunahme der Rasterwechseffizienz, verglichen mit pCD2. Erst die Nukleotide 500-533 in pCD5 ändern dramatisch die Häufigkeit des Rasterwechsels. Erstaunlicherweise zeigt auch pCD6, der praktisch die Informationen der niedrig effizienten pCD3 und pCD4 in sich vereinigt, beinahe Wildtyp-Effizienz.

Hinweise zu einer möglichen Erklärung dieser Ergebnisse lieferten Daten eines prokaryontischen +1-Rasterwechsels bei der Synthese des Release Faktors RF2 von E.coli (Weiss et al., 1988). Eine genaue Untersuchung dieses Ereignisses ergab eine 6 Basen lange Region auf der mRNA kurz vor dem Stopkodon des ersten Rasters, die zum 3'-Ende der 16S ribosomalen RNA (16SrRNA) von E.coli komplementär war (5 der 6 Basen sind komplementär). Durch Punktmutationsanalyse konnte gezeigt werden, daß die mRNA/rRNA-Basenpaarung an dieser Stelle für den Rasterwechsel verantwortlich ist. Der Austausch eines der sechs Nukleotide auf der mRNA reduzierte die Effizienz des Rasterwechsels von 21 auf 4%, die komplementäre Mutation im Gen für die 16SrRNA restaurierte die ursprüngliche Effizienz.

Also wurde die Nukleotidsequenz des 3'-Endes der entsprechenden eukaryontischen 18SrRNA aus Kaninchen-Retikulozyten in einem Homologiesuchprogramm auf Ähnlichkeiten mit den Deletionsmutanten und der Wildtypsequenz untersucht.

				Stop	Effizienz des Rasterwechsels
pCD1	CGUCGCAG	AAGAUC	UCAAUCU -15Nkt-	UAG	3.0%
pCD5	CGUCGCAG	AAGAUC	UCAAUCU -15Nkt-	UAG	2.3%
pPD1	CGUCGCAG	AAGAUC	UCAAUCU -57Nkt-	UGA	3.0%
pH3182M	CGUCGCAG	AAGAUC	UCAAUCU -15Nkt-	UAG	3.0%
18SrRNA/rev	3' UA	AUGAUC	CUUCCGC.....5'		
		▲ ▲ ▲ ▲ ▲			
				Stop	
pCD2	ACAAUCUC	AAUGUU	AG		0.3%
pCD3	GGAAUCUC	AAUGUU	AG		0.3%
PCD4	GGAAUCUC	AAUGUU	AG		0.6%
PH3182M	GGAAUCUC	AAUGUU	AG		3.0%
18SrRNA/rev	3' U	AAUGAU	CCUCCGC.....5'		
		▲ ▲ ▲ ▲ ▲			

Abb.2.1.14. Sequenzähnlichkeiten von Wildtypsequenz und Mutanten zum 3'-Ende der 18S ribosomalen RNA. Angegeben ist deren komplementäre Sequenz (18SrRNA/rev); die Sequenzähnlichkeiten sind umrahmt und gleiche Nukleotide mit ▲ markiert. Stop = Stopkodon des C-Leserasters; Nkt = Nukleotide.

5 von 6 Basen am Ende des C-Rasters von pCD1, pCD5 und pPD1 sind homolog zum 3'-Ende der 18SrRNA, genau an der Stelle, die von Weiss et al. für die E.coli 16SrRNA beschrieben wurde (Nukleotide 3-8 vom 3'-Ende).

Abb.2.1.14. zeigt die Anordnung der homologen Regionen; zum besseren Vergleich ist die Komplementärsequenz der 18SrRNA (18SrRNA/rev) aufgeführt. Alle diese Mutanten zeigten eine hohe Effizienz des Rasterwechsels; diese Sequenz ist nicht in den niedrig effizienten Mutanten pCD2, pCD3 und pCD4 enthalten. Für diese kann ebenfalls ein gemeinsames Motiv gefunden werden, es beinhaltet allerdings das Stopkodon des C-Rasters und liegt näher am 3'-Ende der rRNA, so daß dieses nicht ganz den Weiss'schen Vorgaben entspricht. Auch für pCD6 findet man Sequenzähnlichkeiten, 12 Basen vom 3'-Ende der 18SrRNA entfernt.

Um festzulegen, ob diese Sequenzähnlichkeiten für den in vitro beobachteten Rasterwechsel eine Bedeutung haben, wurden Deletionsmutanten von pCD5 erzeugt. pCD5 besitzt eine hohe Rasterwechseleffizienz und unterscheidet sich vom wenig effizienten pCD2 nur durch die zusätzlichen Nukleotide 500-533 zwischen der AccIII- und Aval-Schnittstelle. Hier sollte es möglich sein, durch Exonukleaseverdau diese Basen schrittweise zu entfernen und die Sequenz festzulegen, die für den Rasterwechsel in pCD5 verantwortlich ist.

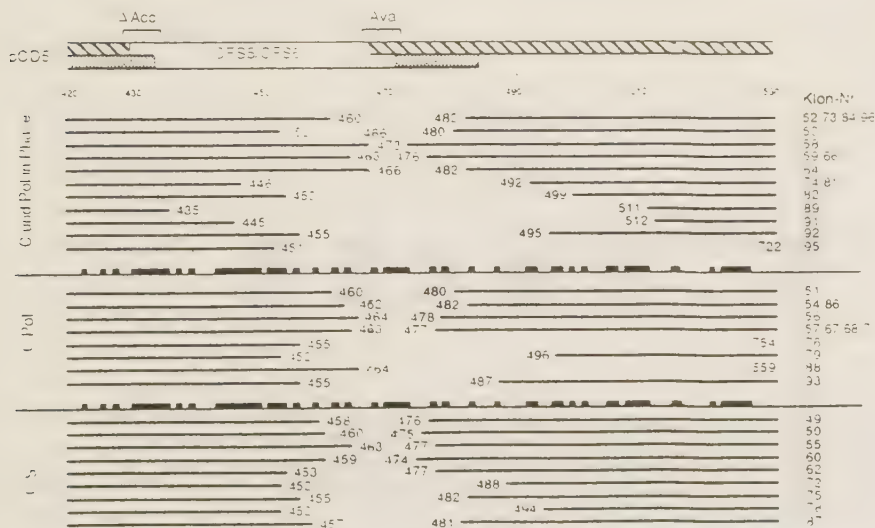


Abb.2.1.15. Deletionsmutanten von pCD5. Die Position des jeweils ersten Nukleotids der 5'- und 3'-nichtdeletierten Region sind angegeben. Schwarze Blöcke stellen G-C-Basenzügel dar; Δ = C-, Δ = Pol-Gen; Δ = AccIII = deletierte AccIII-Schnittstelle.

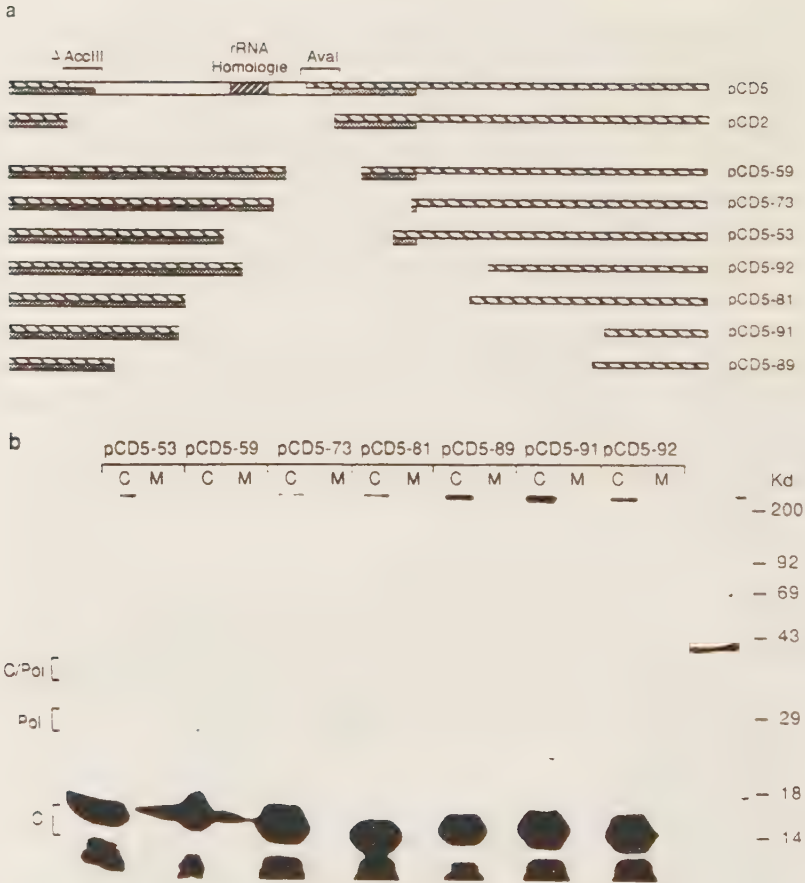


Abb. 2.1.16. a) Ausgewählte Deletionsmutanten von pCD5 zur in vitro Translation. Die jeweils deletierten Bereiche sind offen. rRNA Homologie = Sequenzähnlichkeit zum 3'-Ende der 18SrRNA; Δ AccII = deletierte AccII-Schnittstelle. b) Autoradiogramm in vitro translatierter, immunpräzipitierter und gelelektrophoretisch aufgetrennter Deletionsmutanten. Die Plasmid-DNA war zur Transkription mit EcoRI linearisiert worden. Die Immunpräzipitation erfolgte mit α HbC- (C) und α MS2- (M) Antikörpern.

Die Verwendung von S1-Nuklease in einer Konzentration, in der sie nicht mehr ausschließlich einzelstrangspezifisch arbeitet, sondern auch doppelsträngige DNA verdaut, ermöglichte einen limitierten exonukleolytischen Verdau. Dazu wurden je 0.3 μ g Aval linearisierter pCD5 1, 2, 3, 5 und 8 Minuten mit 2 Einheiten S1-Nuklease bei 37°C inkubiert und anschließend religiert. 37

Klone wurden durch Sequenzanalyse charakterisiert, als Primer diente das Oligonukleotid HBV367 (Pos. 367-386); der Bereich der jeweiligen Deletionen ist in Abb.2.1.15 schematisch dargestellt. Die Arbeitsweise der S1-Nuklease im Doppelstrangbereich ist nicht streng prozessiv, sondern hängt vom G/C-Gehalt des Substrats ab. Schwarze Kästchen repräsentieren G/C-Basenpaare in der Abbildung, es ist eine Verschiebung der deletierten Sequenzen nach rechts auszumachen, wo sich weniger G/C-Blöcke befinden. In etwa 43% der Deletionsklone blieb die Anordnung der Raster erhalten, 32% führten zu Fusion von C mit Pol und 25% zur Fusion des C- an das S-Raster. Sieben dieser Mutanten wurden für die in vitro Experimente ausgewählt. Die Deletionen umfassen schrittweise die gesamte Sequenz, die pCD5 von pCD2 unterscheidet. Sie sind in Abb.2.1.16a nochmals aufgeführt, darunter in b das Ergebnis der Immunpräzipitationen. Ausnahmslos alle Mutanten zeigten C/Pol-Fusionsproteine, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz. Drei davon (pCD5-59, pCD5-73 und pCD5-92) hatten eine pCD5 entsprechende Effizienz, wobei in pCD5-82 die rRNA-Homologie bereits fehlte. Die Deletion dieser Sequenzähnlichkeit zum 3'-Ende der 18SrRNA verhinderte also weder den hoch noch den niedrig effizienten Rasterwechsel. Die niedrigste der Effizienzen entsprach derjenigen von pCD2.

2.1.7. Punktmutanten

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, daß keine der Deletionsmutanten in der Lage war, den Rasterwechsel völlig zu unterbinden. Möglicherweise waren durch die Deletionen kryptische Signale zum Leserasterwechsel aktiviert worden, oder es sind sogar in einem bestimmten Ausmaß Rasterwechsel in den verwendeten Systemen üblich. So sollten abschließende Experimente die Fragen versuchen zu klären, ob a) durch den Einbau von Stopkodons in das C-Gen, also geringstmögliche Veränderungen des natürlichen Kontextes, der Ort des Rasterwechsels einzugrenzen ist und b), ob es auch zu anderen Ungenauigkeiten während der Proteinbiosynthese in den verwendeten Translationssystemen wie dem Übersetzen eines Stopkodons kommt.

Die Punktmutanten wurden nach der Gap-Duplex-Methode hergestellt (Stanssens et al., 1986). Das Arbeitsprotokoll ist im Methodenteil beschrieben, das Prinzip in Abb.2.1.17.a schematisch dargestellt. Man bedient sich zweier Vektoren, die bis auf je eine Mutation in einem der beiden Resistenzgene identisch sind. Der eine, pMa5-8, trägt eine Mutation in Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) und vermittelt Ampicillin-Resistenz; der andere, pMc5-8 trägt eine Mutation im 3-Laktamase-Gen (bla) und vermittelt Chloramphenicol-Resistenz. Die zu mutierenden Sequenzen (hier: HindIII-EcoRI-Fragmente aus pH3182M und pC3182M) wurden in beide Vektoren einkloniert. Abb.2.1.17.a zeigt die Mutagenese des HindIII-EcoRI-Fragmentes von pH3182M mit dem Oligonukleotid HBV360TGA.

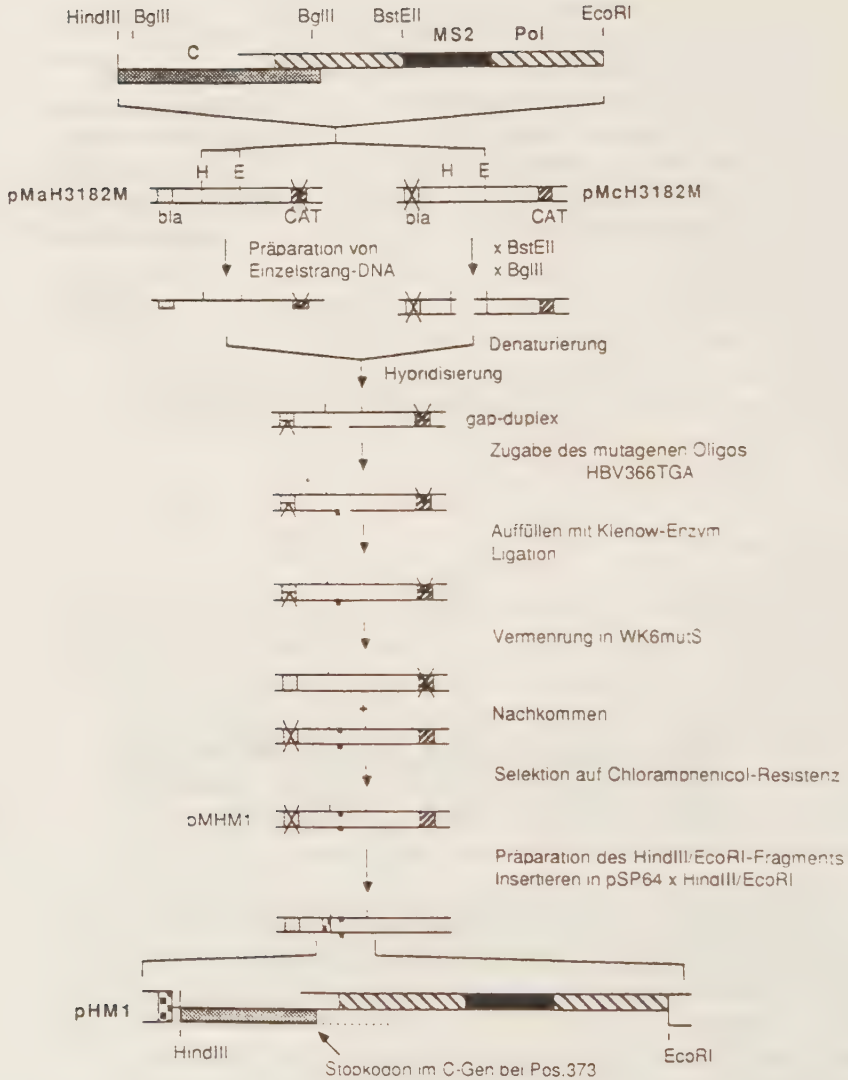


Abb.2.1.17. a) Herstellung von Punktmutanten im C-Pol-Überlappbereich. Schematische Darstellung der Punktmutagenese mithilfe der gap-duplex-Methode. CAT, bla = Gene für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und β -Laktamase (bla).

Aufgrund der Orientierung der mutagenen Oligonukleotide wurden die pMa-Derivate dazu benutzt, mithilfe eines Helferphagen einzelsträngige Phasmid-DNA herzustellen. Die pMc-Derivate wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen (BglII, Pos.84; BstEII, Pos.761) so geschnitten, daß sie nach Denaturierung und Hybridisierung auf das einzelsträngige Phasmid eine Lucke freiließen (Gap-Duplex). In diese wurde anschließend das mutagene Oligonukleotid hybridisiert. Durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Enzym und Ligation der freien Enden wurde der Doppelstrangzustand wiederhergestellt. Der Ligationsansatz wurde in den E.coli-Stamm WKmutS transformiert, der ein defizientes 'Mismatch'-Reparatursystem hat; dadurch blieb die Verbindung zwischen der gewünschten Mutation und dem Antibiotikum-Selektionsmarker gewahrt. Aus den Nachkommen, die beide Genotypen -Wildtyp und Mutation- trugen, wurden durch Aufwachsen unter entsprechendem Selektionsdruck die Nachfahren des mutierten Stranges ausselektiert. Mutanten wurden durch Sequenzanalyse von RAPP-DNA ermittelt. Als Primer für die Sequenzierung, die mit Sequenase™ durchgeführt wurde, diente das Oligonukleotid HBV367 (Pos. 367-386).

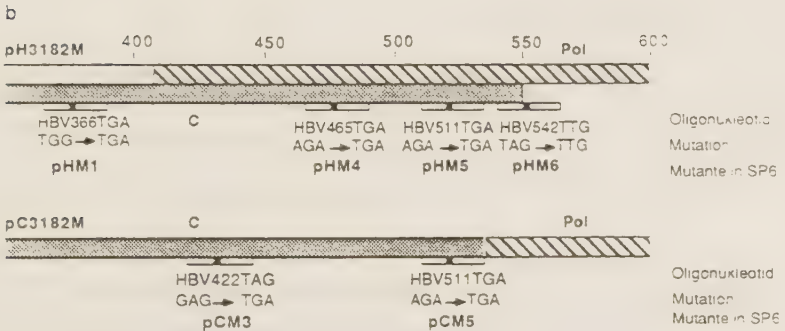


Abb.2.1.17. b) Mutagenese des C/Pol-Überlapps. HBV366TGA, Bezeichnung eines mutagenen Oligonukleotids; TGG -> TGA, die Mutation wandelte ein TGG- in ein TGA-Kodon um
 — = Oligonukleotid; — = C-, — = Pol-Gen.

Fünf verschiedene Oligonukleotide wurden zur Mutagenese des C-Leserasters verwendet, sie sind in Abb.2.1.17.b aufgeführt. Vier davon verwandelten kodierende Tripletts in Stopkodons, eines, HBV542TTG, wandelte das Stopkodon des C-Gens in ein Kodon für Leucin um. Die Effizienz der Mutagenese war sehr unterschiedlich und ist in folgender Tabelle wiedergegeben:

Mutagenes Oligonukleotid	Bezeichnung der Mutante	Klone sequenzier:	davon Mutanten	Effizienz der Mutagenese (%)
HBV366TGA	pMHM1	6	1	17
HBV422TAG	pMHM3	8	0	0
HBV422TAG	pMCM3	6	1	17
HBV465TGA	pMHM4	6	1	17
HBV511TGA	pMHM5	6	4	67
HBV511TGA	pMCM5	6	6	100
HBV542TTG	pMHM6	6	5	83

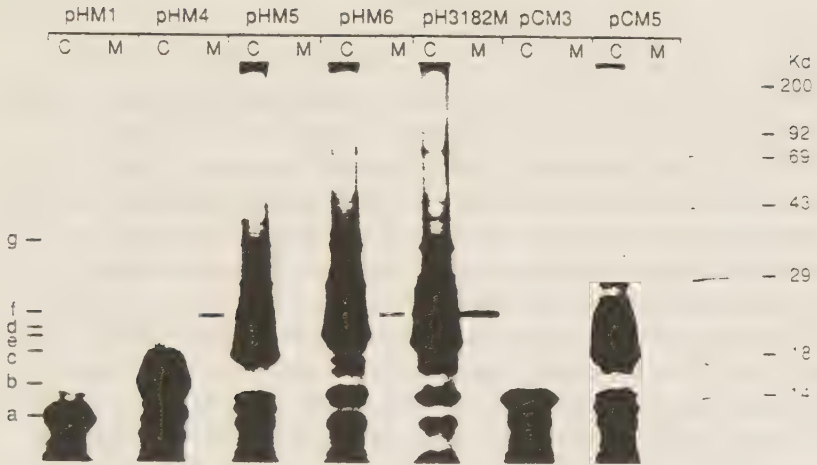
Die mutierten HindIII/EcoRI-Fragmente wurden anschließend aus den pMc-Vektoren wieder in pSP64 umklontiert und mit pHM1-6 (Fragmente ursprünglich aus pH3182M) sowie pCM3 und pCM5 (Fragmente aus pC3182M) bezeichnet.

Die Mutanten wurden mit BamHI linearisiert -eine Linearisierung mit EcoRI war für pMH1 nicht mehr möglich, da mit der Mutation gleichzeitig eine EcoRI-Schnittstelle entstand-, in vitro transkribiert, die RNAs in Retikulozytenlysat translatiert und das Lysat einer Immunpräzipitation mit α C- und α MS2-Antikörpern unterworfen.



Abb.2.1.18. a) Schematische Darstellung des translatierbaren und zum Rasterwechsel benutzbaren C-Leserasters in den verschiedenen Punktmutanten. Die erwarteten C-Proteine sind mit a-c bezeichnet. I = Stopkodon.

b



c

	pHM1	pHM4	pHM5	pH3182M	pCM5
com 2	27330	41300	3380	38600	2620
com 2 Po	219	310	700	1000	1200
Effizienz	0.47	0.45	0.1	0.1	0.7

d

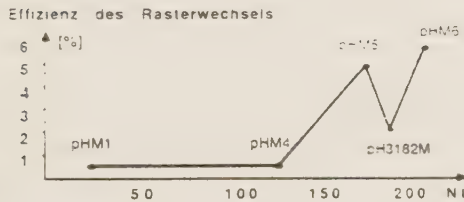


Abb.2.1.18. b) Die *in vitro* translatierten Punktmutanten wurden mit α HBc- (C) und α MS2- (M) Antikörpern immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine a-e sind in a) verdeutlicht. c) die C- und C/Pol-Proteinbanden wurden aus dem getrockneten Proteingel ausgeschnitten und die eingebaute Radioaktivität durch Szintillationszählung bestimmt. Die Effizienz des Rasterwechsels wurde berechnet und auf den unterschiedlichen Methioningehalt korrigiert. d) Effizienz des Rasterwechsels in Abhängigkeit von der Länge der Überlappsequenz. Die Effizienz ist zunächst niedrig (pHM1 und pHM4) und steigt dann innerhalb von 45 Nukleotiden (Nt) sprunghaft an.

In Abb.2.1.18.a ist der Überlappbereich vergrößert dargestellt und verdeutlicht die Lokalisation der Mutationen und die dadurch entstehenden Carboxytermini der C-Proteine; das Autoradiogramm des 17.5%igen Polyacrylamidgeis ist in Abb.2.1.18.b gezeigt. PHM1 enthält 25, pHM4 125, pHM5 170 und pHM6 220 zum Rasterwechsel benutzbare Nukleotide im C/Pol-Überlapp. PCM3 und pCM5 sind Derivate von pC3182M mit Stopkodons 80 bzw. 170 Nukleotide nach Beginn des Überlapps. Sämtliche von pH3182M abstammende Mutanten (pHM1-6), d.h. Mutanten mit den beiden Leserastern C und Pol in ihrer natürlichen Konfiguration, zeigten neben den entsprechend kürzeren (pHM1 = a; pHM4 = b; pHM5 = c) bzw. längeren (pHM6 = d) C-Proteinen und den durch interne Initiation der Translation entstandenen Pol-Proteinen (f) auch C/Pol-Fusionsproteine (g). Als Vergleich diente pH3182M/BamH1. Die Effizienz des ribosomalen Rasterwechsels war zunächst niedrig mit etwa 0.5% bei den beiden Mutanten pHM1 und pHM4, stieg dann sprunghaft auf fast 5% mit pHM5 an und blieb bei 5.7% mit pHM6. Abb.2.1.18.d zeigt die Effizienz des Rasterwechsels in Abhängigkeit von der Länge der zum Rasterwechsel benutzbaren Überlappsequenz. Dazu wurden C- und C/Pol-Proteine aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt; nach Korrektur auf den Gehalt an Methioninen (radioaktive Markierung erfolgte durch ^{35}S -Methionin) wurde das prozentuale Verhältnis C:C/Pol und damit die Effizienz des Rasterwechsels berechnet (Abb.2.1.18.c). Die Messungen sind nur für das in Abb.2.1.18.b gezeigte Gel vorgenommen worden; die Werte für pH3182M variierten zwischen 2.1 und 3% innerhalb unabhängiger Translationen.

Keine C/Pol-Fusionsproteine konnten bei den Mutanten pCM3 und pCM5 nachgewiesen werden. C und Pol waren hier in Phase, Fusionsproteine hatten nur durch Überlesen der Stopkodons nach dem Muster einer amber-Suppression (Phillipson et al., 1978; Yoshinaka, 1985), entstehen können.

Diskussion

Die Synthese von C/Pol-Proteinen durch ribosomalen Rasterwechsel

In den letzten Jahren mehrte sich die Evidenz, daß einige Proteine nur synthetisiert werden können, wenn ein spezifischer ribosomaler Rasterwechsel die Fusion zweier Sequenzen erlaubt, die sich in verschiedenen Leserastern auf der mRNA befinden. Die am besten untersuchten Beispiele dafür sind der Release Faktor 2 von *Escherichia coli* (Craigie und Caskey, 1986; Weiss et al., 1988) bei Prokaryonten, das von einem Hefetransposon kodierte Protein TyA/TyB (Mellor et al., 1985; Wilson et al., 1986; Clare et al., 1988), die gag/pol-Polyproteine von Rous Sarcoma Virus (Jacks und Varmus, 1985) und menschlichem Immundefizienz Virus (Jacks et al., 1988) sowie das gag/pro/pol-Polyprotein des Mouse Mammary Tumor Virus (Jacks et al., 1987) bei Eukaryonten. Die Ähnlichkeit zwischen Hepadnaviren und Retroviren, die Benutzung einer reversen Transkriptase zur Replikation und die Anordnung der entsprechenden Gene, die fehlende mRNA zur Translation eines Pol-Proteins, sowie die Entdeckung von Proteinen, die sich aus Nukleokapsid- und Pol-spezifischen Sequenzen zusammensetzten (Will et al., 1986), führten zur Arbeitshypothese, daß Hepadnaviren einen ähnlichen Syntheseweg zur Expression der reversen Transkriptase einschlagen könnten, einen Rasterwechsel der Ribosomen während der Translation. Dies war die Ausgangssituation am Beginn der Arbeit, wobei zu diesem Zeitpunkt nur der Rasterwechsel bei RSV auf molekularer Ebene analysiert worden war (Jacks und Varmus, 1985).

Der Mechanismus der gag/pol Synthese des Rous Sarcoma Virus wurde mithilfe von in vitro Transkriptions- und Translationssystemen untersucht (Jacks und Varmus, 1985). Mit SP6 RNA-Polymerase wurden mRNAs synthetisiert und in Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert; damit konnte gezeigt werden, daß ein Ereignis auf Translationsebene gag und pol fusioniert. Dieses System wurde hier dazu benutzt, die Synthese hepadnaviraler Pol-Proteine zu untersuchen und die Fähigkeit des C/Pol-Überlapps zur Induktion eines ribosomalen Rasterwechsels mithilfe verschiedener Mutanten zu überprüfen.

Rasterwechsel auf Translations-, nicht auf Transkriptionsebene

Die Translation einer RNA, die das C-Gen und die ersten 580 Basen des Pol-Leserasters enthält, ergab in Kaninchen-Retikulozytenlysat neben HBcAg auch ein C/Pol-Fusionsprotein mit einer Effizienz von ca.5%, das durch Komigration mit einem Kontrollprotein und Immunopräzipitation mit spezifischen Antisera als solches charakterisiert wurde. Neben dem wahrscheinlichsten Mechanismus

nismus der Fusion, einem Rasterwechsel der Ribosomen während der Translation, konnten anfänglich zwei weitere Möglichkeiten nicht völlig ausgeschlossen werden. Die erste war ein transkriptioneller Rasterwechsel, entstanden durch Fehler der SP6-RNA-Polymerase während der RNA-Synthese; um C und Pol in ein Raster zu bringen, genügte die Deletion einer oder die Insertion zweier Basen. Die zweite bestand in einer unkonventionellen Art des RNA-Spleißens, möglicherweise induziert durch die Bedingungen des *in vitro* Systems (Jacks und Varmus, 1985). Beide Möglichkeiten konnten durch die Verwendung eines zweiten *in vitro* Translationssystems, des Weizenkeimextrakts, ausgeschlossen werden. Dieses System zeigte eine dem Retikulozytenlysat vergleichbare Translationseffizienz. Wäre die zur Translation verwendete RNA nicht kolinear mit der DNA-Sequenz gewesen, hätten sich also Veränderungen ergeben, die die beiden Gene C und Pol auf Transkriptionsebene zu einem bestimmten Prozentsatz in Phase gebracht hätten, so hätte das Verhältnis C:C/Pol im Weizenkeimextrakt mit dem im Retikulozytenlysat identisch sein müssen. Da die Effizienz der C/Pol-Synthese im Weizenkeimextrakt um den Faktor fünf geringer war als im Retikulozytenlysat, konnten die C/Pol-Proteine nur durch einen Wechsel der Leseraster auf Translationsebene entstanden sein.

Zur Effizienz der Rasterwechsel

Um die für den Rasterwechsel verantwortlichen Nukleinsäuresequenzen einzugrenzen, wurde eine Reihe von Punkt- und Deletionsmutanten hergestellt. Verschiedene Bereiche der C/Pol-Überlappregion wurden deletiert und die Fähigkeit der restlichen Sequenzen zur Induktion eines Rasterwechsels untersucht. Jede dieser Mutanten besaß offensichtlich die Information für einen Rasterwechsel, die Effizienzen variierten zwischen 0,3 und 5,7%. War möglicherweise eine Effizienz um 0,3% bereits die Höhe des Systemfehlers, um den jede beliebige Sequenz *in vitro* in ein ihr überlappendes Leseraster überführt werden kann?

Die Fehlerrate bei der Translation, die zu Rasterwechseln führt, wurde für *E. coli in vivo* auf 5×10^{-5} Ereignisse pro Kodon geschätzt und variiert von 5×10^{-6} bis 5×10^{-4} (Atkins et al., 1972; Kurland, 1979). Eine vergleichbare Rate ist für die benutzten *in vitro* Translationssysteme bisher nicht bestimmt worden, man nimmt jedoch an, daß sie sich nicht signifikant davon unterscheidet (Clare et al., 1988). Gehen wir vom Mittelwert, 3×10^{-5} pro Kodon, aus und nehmen wir an, daß das Ereignis des Rasterwechsels jeweils an einem definierten Kodon stattfindet. Dann liegt die Häufigkeit des Ereignisses 100-1000mal höher als von einem zufälligen Ereignis erwartet. Dies impliziert einen konzentrischen Mechanismus, der es den Ribosomen erlaubt, Leseraster effizient zu wechseln.

Die Effizienz des beobachteten Rasterwechsels bis 5,7% liegt am unteren Bereich dessen, was für andere Systeme beschrieben wurde. Hier einige Beispiele: RSV gag/pol 5%; HIV-1 gag/pol 11%; MMTV gag/pro 23%, pro/pol 8%; Ty1 TyA/TyB 20% Wildtyp, 0,6-47% in verschiedenen Mutanten. Da die Fusionsproteine dieser Systeme in vivo nachgewiesen werden konnten, war ein direkter Vergleich mit in vitro möglich. In allen Fällen, in denen die Wildtyp-Sequenz verwendet wurde, war die Effizienz, mit der das Fusionsprotein in vitro synthetisiert wurde, vergleichbar mit der in vivo. Auf HBV projiziert hieße das eine circa 3%ige Effizienz der C/Pol-Synthese in vivo.

Zur Lokalisierung der Rasterwechsel

Durch die Punktmutanten pHM4 und pHM5 konnte ein für den effizienten Rasterwechsel (2,2-5,7%) notwendiger Bereich auf die Positionen 475 bis 520 festgelegt werden. Ein Stopkodon bei Pos.475 (pHM4) erlaubte eine Effizienz bis 0,5%, wurde der translatierbare Bereich des C-Gens bis Pos.520 in pHM5 erweitert, stieg die Effizienz auf über 4% an. Wie passt nun dieser Befund zu den Ergebnissen der Deletionsmutanten? In Abb.2.1.19.a ist die C/Pol-Überlappregion der verschiedenen Mutanten vergrößert dargestellt, rechts sind die Effizienzen der Rasterwechsel angegeben. Durch gestrichelte Linien eingefaßt ist der oben erwähnte Bereich, in dem sich pHM4 und pHM5 unterscheiden und der eine Steigerung der Rasterwechseleffizienz um den Faktor 10 erlaubte. Gehen wir zunächst davon aus, daß dieser Bereich alleine für diese Steigerung verantwortlich ist, so sind die Ergebnisse mit pH3182M, pCD1, pCD2, pCD3, pPD1, pHM1, pHM4, pHM5 und pHM6 ohne weiteres verständlich. Nicht ganz in dieses Bild passen pCD4, pCD5 und pCD6. PCD4 enthält etwa die ersten zwei Drittel dieses Bereiches 475-520 und zeigt niedrige Effizienz; pCD5 enthält knapp die zweite Hälfte und weist eine Effizienz von über 2% auf. Die Folgerung daraus, daß die für den Rasterwechsel zuständige Sequenz innerhalb der Positionen 500-520 zu suchen wäre, um die pCD4 und pCD5 überlappen, läßt sich nicht mit den Ergebnissen von pCD6 vereinbaren. PCD6 überlappt nur um 4 Basen mit pCD5 und ist genauso effizient. Diese 4 Basen können nicht alleine verantwortlich sein, da sie auch in pCD4 (0,6%) enthalten sind. Zieht man noch die Ergebnisse der Deletionsmutanten von pCD5 (pCD5-59 bis pCD5-92; Abb.2.1.16.a) mit in Betracht, von denen ein Teil eine pCD5, ein Teil eine pCD2 entsprechende Effizienz zeigt, müssen grundsätzlich mindestens drei unabhängige zum Rasterwechsel führende Ereignisse postuliert werden.

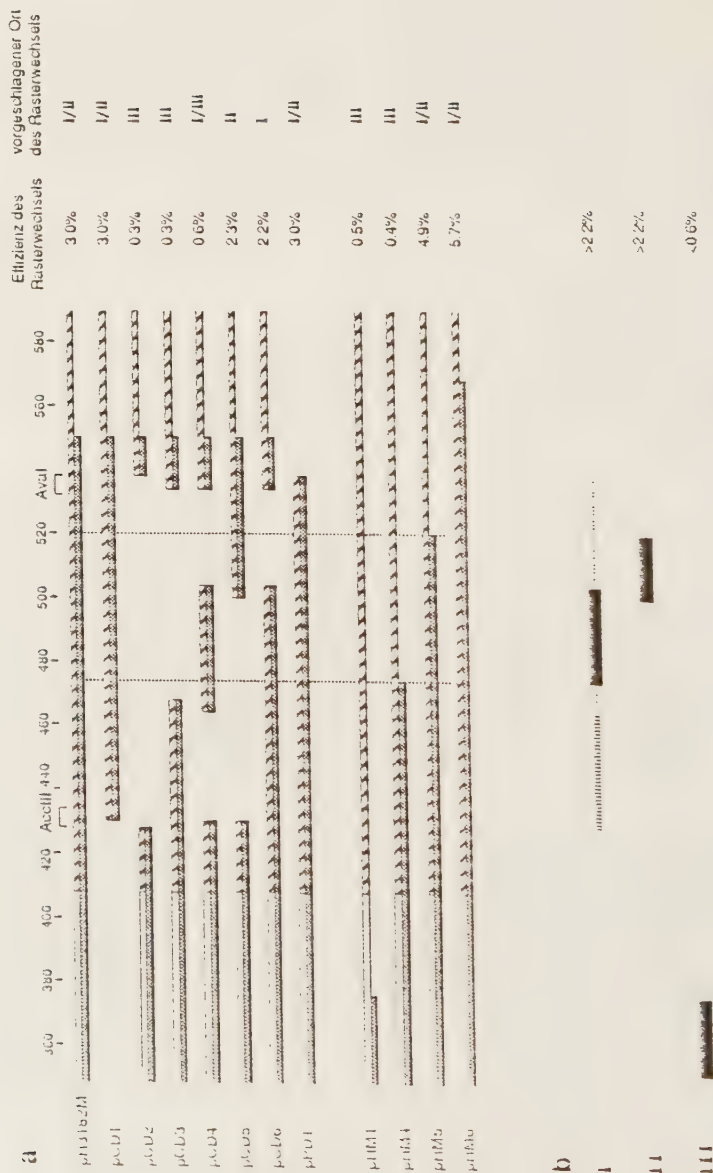


Abb 2.1.19. Festlegung der zum Rasterwechsel notwendigen RNA Sequenzen. a) Überblick über die getesteten Mutanten und die notwendigen Rasterwechselstellen. Die senkrechten Linien begrenzen den durch p111e4 und p111e5 definierten Bereich, in dem die Effizienz um den Faktor 10 ansteigt. b) Durch die Mutanten festgelegte Bereiche effizienter (I und II) und wenig effizienter (III) Rasterwechsel. Schwarze Balken bedeuten den Ort des Rasterwechsels, zusätzliche, für die Effizienz notwendige Sequenzen auf der RNA sind gestrichelt.

Rasterwechsel mit hoher Effizienz

Ein Rasterwechsel mit hoher Effizienz ($> 2\%$) ist innerhalb der Nukleotide 475 bis 500 lokalisiert. Vermutlich sind Sekundärstrukturen auf der mRNA dazu notwendig.

Wird die Sequenz 475-500 alleine angeboten (pCD4), ist die Effizienz im Vergleich zu pCD2 nur unwesentlich erhöht. Fügt man die Positionen 425-460 hinzu (pCD6), ist ein deutlicher Anstieg festzustellen, der sich noch erhöht durch die Positionen 500-520 (pHM5 und pPD1). In Abb.2.1.19.b unter I. aufgeführt sind der Bereich dieses Rasterwechsels und die mutmaßlich dazu notwendigen zusätzlichen Sequenzen auf der RNA. Als Mechanismus konnte man, ähnlich wie es für die gag-pol Synthese von RSV und HIV-1 beschrieben wurde, ein "Verrutschen" einer normalen tRNA um eine Nukleotid spekulieren. Eine Möglichkeit dazu ist in Abb.2.1.20.a dargestellt, bei der nach der Dekodierung des Prolin-Kodons (CCC) bei Pos.481 ein -1 -Rasterwechsel der tRNA zum Prolin-Kodon (CCU) des Poi-Rasters stattfindet. Die dritte Base bleibt dabei ungepaart (Jacks et al., 1988a).

Für die -1 -Rasterwechsel von RSV, HIV-1 und MMTV werden zusätzliche Sequenzen 5' und eine Sekundärstruktur der RNA 3' der am Rasterwechsel beteiligten Sequenz UUUU diskutiert (Jacks et al., 1988, 1988a). So war beispielsweise ein kurzes Stück des gag/pro und pro/pol Überlapps von MMTV in einer fremden Umgebung nicht ausreichend, eine Fusion der Proteine zu erreichen (Jacks et al., 1987). Eine ähnliche Situation konnte sich auch bei HBV ergeben haben, daher die Notwendigkeit zusätzlicher Sequenzen (425-460; 500-520) und eine nur geringe Effizienz des Rasterwechsels bei pCD4. Bei dem einzigen bisher näher untersuchten eukaryontischen -1 -Rasterwechsel, der Synthese des TyA/TyB-Proteins des Hetertransposons Ty1, bestehen solche Erfordernisse allerdings nicht; hier genugte eine 14 Basen lange Sequenz in einem fremden Kontext, um mit Wildtyp-effizienz das Leseraster zu wechseln (Clare et al., 1988).

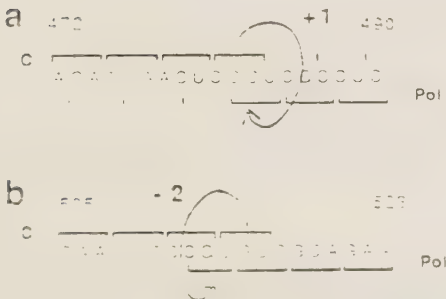


Abb.2.1.20. Mögliche Mechanismen des Rasterwechsels. a) -1 -Rasterwechsel im Fall von I. (Abb.2.1.19.b), b) -2 -Rasterwechsel im Fall von II.

Einen weiteren Ort des Rasterwechsels mit hoher Effizienz definierten die Deletionsmutante pCD5 und deren Derivate pCD5-59, pCD5-73 und pCD5-92. Er konnte auf die Positionen 500-520 lokalisiert werden. Der Rasterwechsel in dieser Region kann ebenfalls für den Wildtyp, pCD1, pPD1, pHM5 und pHM6 in Betracht gezogen werden und scheint keine zusätzlichen Sequenzen nötig zu haben. Diese Situation ähnelt der bereits beschriebenen im Hefetransposon Ty1; es müßte daher möglich sein -und das wird eines der zukünftigen Projekte sein-, diese 20 Basen in einen fremden, normalerweise das Leseraster nicht wechselnden Kontext zu insertieren und damit einen Leserasterwechsel zu induzieren, dessen Effizienz 2% übersteigt.

Da der Ort des +1-Rasterwechsels bei der TyA/TyB-Synthese noch nicht auf ein Kodon festgelegt wurde, kann mangels Präzedenz auch im Falle des Rasterwechsels zwischen den Positionen 500 und 520 nur spekuliert werden. Nach Dekodierung des Arginin-Kodons bei Position 514 (CGU) könnte die tRNA um zwei Nukleotide zurückrutschen auf das Arginin-Kodon CGC bei Position 512, wodurch sich die Translation im Pol-Raster fortsetzen würde (Abb.2.1.20.b).

Rasterwechsel mit niedriger Effizienz

Unabhängig von den beiden oben beschriebenen Ereignissen findet ein Rasterwechsel am äußeren 5'-Ende des C/Pol-Überlapps statt; er wird durch die Punktmutante pHM1 charakterisiert, ist wenig effizient (< 0,6%) und innerhalb der Positionen 350 bis 375 lokalisiert. Die verwendeten Mutanten geben keinen Aufschluß darüber, ob zusätzliche RNA-Sequenzen notwendig sind, die erste Deletion beginnt erst bei Pos.428. Dieser Rasterwechsel ist spezifisch für die Sequenz 350-375, da seine Effizienz nicht ansteigt mit einem verlängerten translatierbaren Bereich des C-Gens in pHM4.

In dieser Region konnten keine Kodons ausgemacht werden, die einen Rasterwechsel, wie er in Abb.2.1.20.a und b vorgeschlagen wurde, unterstützen konnten. Es wäre hier als nunmehr dritte Alternative eine Frameshift-Suppressor-tRNA denkbar, eine tRNA also, die im Normalfall für die Korrektur von Mutationen verantwortlich ist, die den Leserahmen verändern. Diese Art tRNAs scheinen 2- oder 4-Nukleotidkodons 'lesen' zu können (Fox und Weiss-Brummer, 1980, Bruce et al., 1986). Die Verwendung einer solchen tRNA mit 4 Basen im Antikodon würde eine C/Pol-Fusion bewirken.

Für einen sehr effizienten Rasterwechsel in E.coli bei der Synthese des Release Factors RF2 beschrieben Weiss et al. (1988) eine dafür notwendige und ausreichende 15 Basen lange Region auf der mRNA. Diese besteht aus zwei Elementen, dem Ort des Rasterwechsels, der das Stopkodon

des ersten Rasters beinhaltet und einer zum 3'-Ende der 16SrRNA komplementären Region; diese ist für die hohe Effizienz des Rasterwechsels verantwortlich, unabhängig von der Lokalisation des Stopkodons. Solche Homologien konnten auch zwischen der eukaryontischen 18SrRNA (aus Kaninchen-Retikulozyten) und Sequenzen aus dem C/Pol-Überlapp identifiziert werden. Sie sind offensichtlich jedoch für keinen der definierten Rasterwechsel von grundlegender Notwendigkeit, wenn auch eine Beteiligung am Rasterwechsel I (Abb.2.1.19.b) nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Translation von Virion RNAs von Moloney Murine Leukemia Virus und Moloney Murine Sarcoma Virus in Kaninchen Retikulozytenlysat führte mit einer Effizienz von 2% zur Synthese von gag/pol-Proteinen, entstanden durch Suppression eines amber Stopkodons am 3'-Ende des gag-Gens (Philipson et al., 1978). Stopkodon-Suppression konnte in keiner der getesteten Punktmutanten pCM3 und pCM5 nachgewiesen werden; diese enthielten Stopkodons im C-Gen und dahinter, in Phase, das Pol-Raster. Dieses Ergebnis unterstreicht die Spezifität der -1-Rasterwechsel und zeigt gleichzeitig die Häufigkeit eines Translationsfehlers, der Suppression von Stopkodons, in diesem in vitro Translationssystem. Ein noch messbares Fusionsprotein läge im Bereich von 0.05% Effizienz; die Fehlerhäufigkeit liegt daher unter 5×10^{-4} pro Kodon.

Welcher der drei Bereiche aus Abb.2.1.19.b für den Rasterwechsel in der Wildtypumgebung verantwortlich zeichnet, oder ob sie gleichzeitig benutzt werden, kann mit Punkt- und Deletionsmutanten nicht beantwortet werden. Dazu bedarf es der Anreicherung von C/Pol-Proteinen aus Retikulozytenlysat mithilfe des α MS2-Antikörpers und Bestimmung der Aminosäuresequenz. Ein Problem stellen die durch interne Initiation der Translation entstandenen Pol-Proteine dar, die ebenfalls isoliert würden. Eine Punktmutante, in der das Pol-ATG durch ATA ersetzt ist und die das Problem der internen Initiation umgehen sollte, wurde bereits hergestellt (nicht gezeigt). Um den Anteil an HBcAg im Fusionsprotein möglichst gering zu halten, fehlt noch die Insertion eines ATGs kurz vor der Überlappsequenz; eine solche Konstruktion wird dann zur in vitro Translation eines zur Sequenzierung geeigneten C/Pol-Fusionsproteins benutzt werden.

Bedeutung des in vitro beobachteten C/Pol-Rasterwechsels für die Synthese der reversen Transkriptase in vivo

Die Beobachtung von C/Pol-Fusionsproteinen in einigen menschlichen HBV-assoziierten Lebertumoren führte zur Formulierung der Arbeitshypothese, Hepadnaviren könnten ihre Polymerase in analoger Weise wie viele Retroelemente synthetisieren, durch Rasterwechsel der Ribosomen von C nach Pol während der Translation. Die Effizienz des Rasterwechsels wurde zu

bestimmtes Verhältnis von Nukleokapsid- zu Polymerasemolekülen gewährleisten, die Synthese der Polymerase wäre zeitlich gekoppelt an die Synthese der Nukleokapsidproteine und der Kapsidanteil könnte zur Verpackung des Enzyms in Core-Partikel dienen. Die Fähigkeit des C/Pol-Überlapps zur Induktion eines Rasterwechsels wurde in dieser Arbeit gezeigt.

Schlicht et al. (1988) gingen die Untersuchungen zur Expression des Pol-Leserasters von einer anderen Seite an und konnten nachweisen, daß ein ribosomaler Rasterwechsel für die Expression einer DHBV-Polymerase nicht notwendig ist. Sie benutzten ein Zellkultursystem und erhielten durch Kotransfektion zweier mutierter DHBV-Genome, eines mit einem Stopkodon im C-Gen, das andere mit einem im Pol-Gen, lebensfähige Viren. Die Defekte konnten in trans komplementiert werden, was einen Rasterwechsel als Syntheseweg der Polymerase auszuschließen scheint.

Welche Bedeutung haben nun die hier vorgestellten Ergebnisse für die Expression des Pol-Genes in vivo, welche Mechanismen sind vorstellbar? Neben einem Rasterwechsel und interner Initiation der Translation auf der C-mRNA sind eine bisher nicht entdeckte Pol- oder eine gespleißte mRNA denkbar. Ergebnisse, die durch Translation einer C-mRNA in Weizenkeimextrakt erhalten wurden -das in vitro System, das bezüglich Translations-Initiation am ehesten der Situation in vivo ähnelt (Kozak, 1988)-, favorisierten einen ribosomalen Rasterwechsel vor interner Initiation der Translation auf der C-mRNA; diese Daten schließen eine Initiation der Translation am Pol-AUG auf einer Pol-mRNA nicht aus. Die Zellkulturdaten von Schlicht et al. wiederum demonstrierten, daß ein Rasterwechsel nicht nötig ist. Sollten beide Synthesewege -Rasterwechsel und Initiation am Pol-AUG- in vivo parallel zur Expression der Polymerase benutzt werden? Alle bisher sequenzierten Hepadnaviren besitzen ein ATG am 5'-Ende des Pol-Genes; es besteht also keine zwingende Notwendigkeit -außer vielleicht einer regulatorischen- zu einem Rasterwechsel. Die oben beschriebene Fähigkeit, das C-Leseraster zu wechseln, könnte eine in vivo stumme Eigenschaft sein, die die Hepadnaviren von einem mit Retroviren gemeinsamen Urahn (Miller und Robinson, 1986) behalten haben, verbunden mit der Organisation der beiden Gene. Unter unnatürlichen Bedingungen, beispielsweise in vitro, könnte die Fähigkeit zum ribosomalen Rasterwechsel reaktiviert und zur C/Pol-Synthese benutzt werden.

Bei dieser Diskussion bisher unberücksichtigt blieben die von Will et al. (1986) beschriebenen C/Pol-Fusionsproteine in Tumoren HBV-infizierter Patienten. Für deren Synthese bestehen zwei Erklärungsmöglichkeiten. Erstens, sie entstanden durch Fusion der beiden Gene, bedingt durch Rearrangements der integrierten HBV-DNA. Dagegen spricht, daß bisher in mehreren Tumoren C/Pol-Proteine der gleichen Größe nachgewiesen werden konnten (Will, unveröffentlicht), was voraussetzen würde, daß die Integrate in diesen Tumoren die gleichen Rearrangements aufweisen. Dies ist unwahrscheinlich, definierte Veränderungen der chromosomal integrierten viralen DNA wurden bisher nicht beschrieben. Die zweite Möglichkeit wäre die Synthese der C/Pol-Proteine durch ribosomalen Rasterwechsel. Die Initiation der Translation kann aber nicht am C-

AUG stattgefunden haben, da in den Tumoren kein HBcAg nachgewiesen werden konnte und die C-Pol-Proteine den Aminoterminus von HBcAg vermutlich nicht beinhalten (Will et al., 1980). Integration im C-Gen könnte also für die geänderte Expression verantwortlich sein, eine Initiation der Translation am GUG bei Pos.37 (Weimer, 1985) oder an den AUGs Pos.196 oder 277 stattgefunden haben. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist der ribosomale Rasterwechsel in vitro unbeeinflusst durch die Initiation der Translation am AUG Pos.196.

Eine endgültige Entscheidung darüber, welcher Mechanismus in vivo zur Synthese der Polymerase verwendet wird, oder ob beide Synthesewege benutzt werden -und möglicherweise zu Proteinen unterschiedlicher Funktion führen-, kann nur durch den Nachweis der entsprechenden Pol-Proteine in der infizierten Leber oder im Virus und deren Sequenzierung herbeigeführt werden.

2.2. Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten des Carboxyterminus von Pol zu bekannten RNaseH-Molekülen

Die Ribonuklease H (RNaseH) ist ein für den Replikationszyklus revers transkribierender Viren notwendiges Enzym, das während der Synthese des ersten DNA-Strangs die (prä)genomische RNA abbaut. Im Falle von Retroviren ist diese Enzymaktivität im Pol-Gen kodiert; dies wurde zunächst durch Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zur RNaseH von E.coli (Johnson et al., 1986) vorgeschlagen und kürzlich durch funktionelle Analysen der Pol-Proteine des menschlichen Immundefizienzvirus 1 (HIV-1; Hansen et al., 1988) und Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV; Tanese et al., 1988) bestätigt. Da auch die revers transkribierenden Hepadnaviren eine solche Enzymaktivität benutzen (Summers und Mason, 1982), sollten Sequenzen der hepadnaviralen Pol-Genprodukte auf Ähnlichkeiten mit bekannten und vermuteten RNaseH Sequenzen untersucht werden.

In Zusammenarbeit mit Drs. Florian Schödel und Rolf Sprengel wurden die von der Nukleotidsequenz der Pol-Raster abgeleiteten Aminosäuresequenzen von HBV und DHBV, den beiden entferntest verwandten Mitgliedern der Hepadnaviren, mit bekannten RNaseH Sequenzen verglichen. Die Sequenzvergleiche wurden auf einer Vax (DEC, Maynard, USA) mit UWGCG-Software (University of Wisconsin Genetics Computer Group, Version 5, 1987) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb.2.2.1. gezeigt. Hervorgehoben sind Aminosäuren, die zwischen mindestens zwei Sequenzen identisch sind. Die Aminosäuresequenzen wurden von folgenden publizierten DNA-Sequenzen translatiert:

- Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) hypothetisches Protein V, Aminosäuren 542-679 (Franck et al., 1980)
- Drosophila copia-like Element 17.6 (17.6) vermutliche Polymerase, Aminosäuren 385-548 (Toh et al., 1985)
- E.coli RNaseH (E.coli) Aminosäuren 1-155 (Kanaya und Crouch, 1988)
- Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Pol-Polyprotein, Aminosäuren 635-793 (Shinnick et al., 1981)
- Humanes Immundefizienzvirus 1 (HIV) Pol-Polyprotein, Aminosäuren 589-725 (Wain-Hobson et al., 1985)
- Rous Sarcoma Virus (RSV) Pol-Polyprotein, Aminosäuren 441-573 (Schwartz et al., 1983)
- Enten Hepatitis B Virus (DHBV) Translationsprodukt des Pol-Leserasters, Aminosäuren 657-793 (Sprengel et al., 1985)

- Hepatitis B Virus (HBV) Translationsprodukt des Pol-Leserasters, Aminosäuren 680-832 (Galibert et al., 1979)

CaMV
17.6
E.coli
MMLV
HIV
RSV
DHBV
HBV

CaMV
17.6
E.coli
MMLV
HIV
RSV
DHBV
HBV

CaMV
17.6
E.coli
MMLV
HIV
RSV
DHBV
HBV

17.6
E.coli
MMLV
HIV
RSV
DHBV
HBV

Abb.2.2.1. Vergleich zwischen Pol-Sequenzen von Hepatitis B Virus (HBV) und Enten Hepatitis B Virus (DHBV) mit der RNaseH-Sequenz von *Escherichia coli* (E.coli) und Pol-Sequenzen des Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV), des menschlichem Immundefizienzvirus (HIV), des Rous Sarcoma Virus (RSV), des copia-like Elements 17.6 (17.6) und des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV). Aminosäuren, die in mindestens zwei Sequenzen identisch sind, wurden hervorgehoben.

Einige exemplarische Werte für die Sequenzähnlichkeiten seien im folgenden aufgeführt:

- E.coli RNaseH / MMLV Pol: Ähnlichkeit 51.7%
- E.coli RNaseH / DHBV Pol: Ähnlichkeit 46.9%;
- RSV Pol / DHBV Pol: Ähnlichkeit 48.8%;
- MMLV Pol / RSV Pol: Ähnlichkeit 47.4%.

Aufgrund dieser Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten ist es wahrscheinlich, daß eine RNaseH-Domäne am Carboxyterminus des Pol-Translationsproduktes von Hepadnaviren lokalisiert ist. Sie wäre damit durch eine weniger konservierte Region von etwa 80 Aminosäuren von der bereits beschriebenen aminoterminal davon gelegenen Sequenzähnlichkeit zu retroviralen reversen Transkriptasen (Toh et al., 1983; Toh et al., 1985) getrennt. Durch Analyse von Punktmutanten in dem hier als RNaseH-Domäne beschriebenen Bereich konnte inzwischen die funktionelle Bedeutung der Region bestätigt werden (G.Radziwill und H.Schaller, persönliche Mitteilung). Einige der zwischen den RNaseH-Molekülen von E.coli und Retroviren konservierten Aminosäuremotive konnten auch in den vermutlichen Polymerasegenprodukten des Drosophila copia-like Elements 17.6, eines Retrotransposons, und von Cauliflower Mosaic Virus, eines durch reverse Transkription replizierenden DNA-Virus aus Pflanzen, nachgewiesen werden (zur Übersicht: Mason et al., 1987).

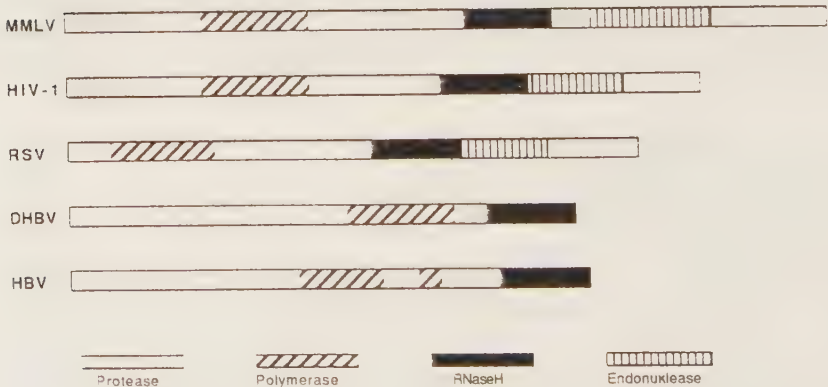


Abb.2.2.2. Schematische Anordnung von Sequenzähnlichkeiten zwischen retroviralen und hepadnaviralen Pol-Genprodukten.

Abb.2.2.2. zeigt schematisch die Anordnung von Sequenzähnlichkeiten in bekannten und vermuteten Enzymdomänen retro- und hepadnaviraler Pol-Proteine. Die ähnlichen Aminosäuresequenzen der Protease-, reverse Transkriptase- und Endonuklease-Domänen sind angegeben, wie sie von Toh et al. (1983) vorgeschlagen worden waren; sie wurden durch die oben beschriebene RNaseH Region ergänzt. Es kann eine gemeinsame Abfolge der enzymatischen Domänen erkannt werden, (Protease) - reverse Transkriptase - RNaseH - (Endonuklease). Als Ausnahme davon scheint die Endonuklease-Domäne im Hefetransposon Ty912 und im copia Element von *Drosophila* 5' der reversen Transkriptase-Domäne lokalisiert zu sein (Fuetterer und Hohn, 1987). Zwischen den Endonuklease-Domänen der Retroviren und hepadnaviralen Pol-Genprodukten konnten keine Sequenzähnlichkeiten gefunden werden; dies ist verständlich, da eine Integration der Hepadnaviren ins Wirtsgenom während der Replikation im Gegensatz zu Retroviren nicht stattfindet.

Sequenzähnlichkeiten bekannter Proteasen zu hepadnaviralen Pol-Genprodukten konnten nicht identifiziert werden.

2.3. Nachweis von Antikörpern gegen Pol-Proteine in Seren HBV infizierter Patienten

Das zeitliche Erscheinen von Antikörpern gegen virale Proteine während einer HBV-Infektion gibt Aufschluß über den Verlauf der Krankheit. Bisher wurden vorwiegend Antikörper gegen Strukturproteine beschrieben (Arnold et al., 1975; Landers et al., 1977; Howard, 1986; Klinkert et al., 1986), kürzlich erst Antikörper gegen das Translationsprodukt des X-Leserasters (Kay et al., 1985; Pfaff et al., 1987). Das Auffinden X-spezifischer Antikörper war ein indirekter Hinweis für die Expression dieses Leserasters in vivo. Antikörper gegen Pol-Genprodukte würden einen neuen serologischen Marker der Infektion darstellen und gaben einen Hinweis auf die Expression des Pol-Leserasters in vivo.

Der experimentelle Ansatz zum Nachweis von anti-Pol-Antikörpern bestand in der in vitro Translation von Teilstücken des Pol-Proteins und deren Benutzung als Antigen in der Immunpräzipitation mit Patientenseren.

2.3.1. Konstruktion der SP6/Pol-Plasmide

Zusätzlich zu dem bereits aus Abb.2.1.3. bekannten Plasmid pH346, das die Nukleotide 346-1280 der HBV-Sequenz in pSP64 enthält und dessen RNA die Translation des aminoterminalen Teils des Pol-Polypeptids steuert, wurden drei weitere Plasmide konstruiert, die die Synthese verschiedener Bereiche des Pol-Proteins erlauben. Eine Schwierigkeit ergab sich aus dem Fehlen von ATGs in den Polylinkern der beiden bekannten SP6-Vektoren, pSP64 und pSP65 (Melton et al., 1984). Jedes einklonierte Fragment mußte also ein zur Translation benutzbares ATG mitbringen, was im Falle des Pol-Rasters nicht immer möglich war. So wurden die Polylinker aus pSP64 und pSP65 durch vielseitigere Linker ersetzt, die nicht nur Schnittstellen für andere Restriktionsenzyme enthielten, sondern auch ein bzw. zwei Initiationskodons. Die Konstruktion dieser Derivate ist im Anhang beschrieben.

Die nachfolgend aufgeführten SP6/Pol-Plasmide und die als Antigene in der Immunpräzipitation verwendeten Proteine sind in Abb.2.3.1. schematisch dargestellt. Ein Großteil des Pol-Rasters, ab Pos.938 bis zum Ende, wurde als BglII/FspI-Fragment (Nt.938-3084; pKW938) in BamHI/SmaI-geschnittenen pSP65-2 inseriert. Ein zur Initiation der Translation verwendbares ATG stellte der Polylinker des Vektors. Ein von der RNA pKW938/AccI translatiertes Protein enthält den Mittelteil der Polymerase einschließlich der Homologieregion zu retroviralen reversen Transkriptasen (Toh et al., 1983). pKW1770 besteht aus dem Vektor pSP64, in dessen BamHI-Schnittstelle die Nt.1770-2682 als BamHI-Fragment einkloniert wurden. Die Translation initiiert

am AUG des Pol-Leserasters bei Pos.1776. Die vermutliche RNaseH-Domäne (Kap.2.2.) konnte von pKW2274 exprimiert werden; in die SmaI-Schnittstelle von pSP64-4 wurde das HindII-Fragment Nt.2274-2966 inseriert. Die Translation startete wiederum an einem AUG im Linker-Bereich.

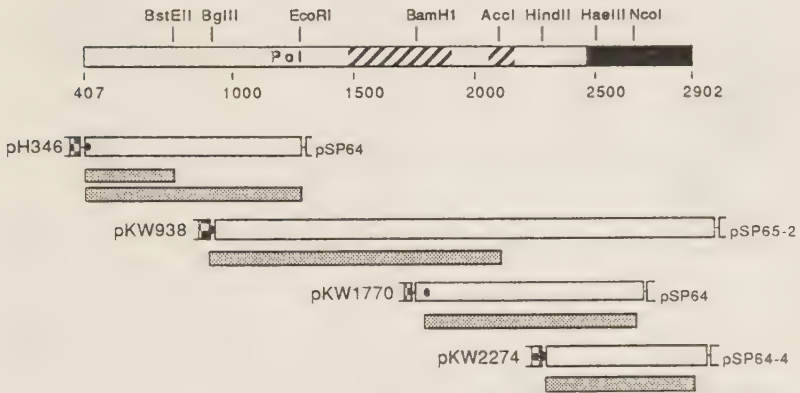


Abb.2.3.1. Konstruktion der SP6/Pol-Plasmide und die zum Nachweis Pol-spezifischer Antikörper verwendeten Antigene (unterlegt). Schraffiert ist der Bereich der Sequenzähnlichkeit zu reversen Transkriptasen, schwarz der zu RNaseH-Molekülen. = SP6 Promoter; • = das jeweils erste zur Initiation der Translation benutzbare Initiationskodon im Pol-Raster.

2.3.2. Immunpräzipitation mit Patientenseren

Oben beschriebene Plasmide wurden linearisiert (pH346/BstEII, pH346/EcoRI, pKW938/AccI, pKW1770/NcoI und pKW2274/KpnI), in vitro transkribiert und im Retikulozytenlysat translatiert. Das Ergebnis der Translation wurde zunächst auf einem analytischen Gel überprüft, pro Translationsansatz wurden je 1.5µl auf einem 17.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb.2.3.2.a). Neben den erwarteten Translationsprodukten mit den vorhergesagten Molekulargewichten wurden vor allem bei pKW938, pKW1770 und pKW2274 kleinere Proteine synthetisiert, die vermutlich durch Initiation der Translation an internen AUGs entstanden waren.

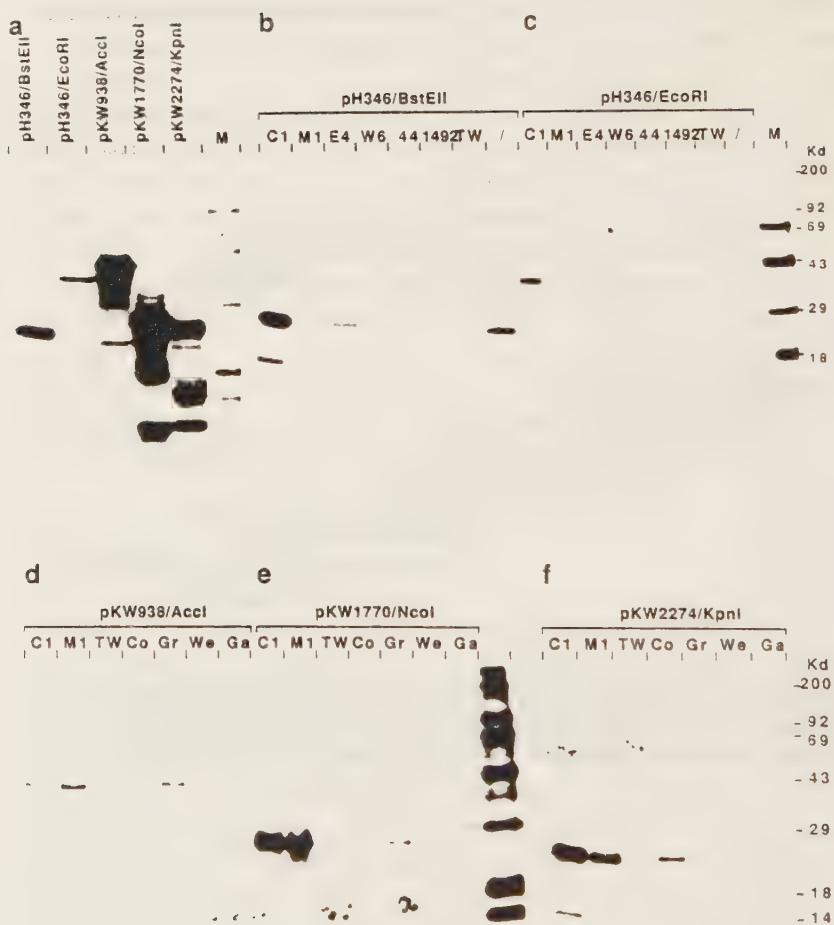


Abb.2.3.2. Nachweis Pol-spezifischer Antikörper in Patientenseren. a) Autoradiogramm der gelanalytischen Kontrolle der *in vitro* Translationsprodukte. Die Antigene sind nach dem Plasmid (z.B. pH346) und der zur Transkription verwendeten Linearisierung (z.B. BstEII) bezeichnet (→ pH346/BstEII). b-f) Die in a) gezeigten Antigene wurden mit Patientenseren immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (17.5%iges SDS-Polyacrylamidgel). C1, M1, etc. = Bezeichnung der Patientenseren. Negativkontrolle = TW; / = unpräzipitiert; M = Proteingroßenstandard.

Die bei der *in vitro* Translation radioaktiv markierten Proteine, die in Abb.2.3.1 als schattierte Kästchen aufgeführt sind, dienten sodann als Antigene zum Nachweis von α Pol-Antikörpern in Seren akut (Co, Ga) und chronisch (C1, M1, E4, W6, 44, 1492, Gr, We) infizierter Patienten. Als Kontrolle der Immunpräzipitation diente ein HBV-negatives Serum (TW). Jeweils 50 μ l ProteinA-Sepharose (Gelbett) wurden mit 10 μ l Serum eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, gewaschen und 2 h mit je 8 μ l eines Translationsansatzes inkubiert; nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine in 50 μ l SDS-Probenpuffer eluiert und die Hälfte nach RNaseA-Verdau auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abb.2.3.2.b-f zeigt die Autoradiogramme der Immunpräzipitationen einiger Seren mit pH346/BstEII (b), pH346/EcoRI (c), pKW938/AccI (d), pKW1770/NcoI (e) und pKW2274/KpnI (f).

Die Gesamtheit der erhaltenen Daten ist in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Serum		C1	E4	M1	W6	44	1492	Gr	Ga	Co	We
Infektion		Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ch	Ak	Ak	Ch
pH346/BstEII	*	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pH346/EcoRI		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pKW938/AccI		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
pKW1770/NcoI		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
pKW2274/KpnI		+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)

Zwei Seren erkannten alle fünf Pol-Proteine; dies ist eine starke Evidenz für die Expression des gesamten Pol-Leserasters *in vivo*. Am häufigsten ist die Immunantwort gegen die vermutlichen Domänen für reverse Transkriptase (pKW1770/NcoI: 5/10 Seren) und RNaseH (pKW2274/KpnI: 10/10 Seren) gerichtet.

Wir können drei Gruppen von Seren unterscheiden. Die erste Gruppe reagierte mit dem gesamten Pol-Protein, die zweite mit dem Mittelteil und Carboxyterminus und die dritte Gruppe nur mit dem Carboxyterminus des Pol-Moleküls. Aufgrund dieses Reaktionsmusters konnten mindestens drei immunogene Bereiche festgelegt und eingegrenzt werden.

C1 und E4 zeigten Reaktion mit pH346/BstEII, ein antigener Bereich befindet sich daher am Aminoterminus der Polymerase, innerhalb der Aminosäuren 1 bis 120. Es ist in Abb.2.3.3. mit 1 bezeichnet.

Die Festlegung des zweiten antigenen Bereiches im Mittelteil der Polymerase gründet sich darauf, daß sechs der getesteten Seren mit pKW938/AccI, aber nicht mit pH346/EcoRI reagierten, diese Seren aber auch alle pKW1770/NcoI erkannten. Da keines der Seren ausschließlich mit pKW938/AccI oder pKW1770/NcoI reagierte, bestehen zwei Interpretationsmöglichkeiten: 1. Es gibt nur einen antigenen Bereich in der Sequenz, die pKW938/AccI und pKW1770/NcoI gemeinsam ist. Diese würde sich in der Domäne für die reverse Transkriptase zwischen Aminosäure 455 und 567 befinden und ist in Abb.2.3.3. mit II gekennzeichnet. 2. Die Reaktion mit pKW938/AccI und pKW1770/NcoI wurde durch zwei Antikörper-Spezifitäten hervorgerufen; die antigenen Bereiche würden zwischen den Aminosäuren 258 und 454 (IIa) und 455 und 622 (IIb) liegen. Es müßten dann in den acht Seren (C1 bis Ga, siehe Tabelle) gleichzeitig Antikörper gegen beide Bereiche vorhanden sein.

Die dritte antigene Region wird vom Carboxyterminus des Pol-Proteins gebildet und wird definiert durch das Verhalten der Seren Co und We, die mit pKW2274/KpnI, aber nicht mit pKW1770/NcoI, reagierten. Sie umfaßt die Aminosäuren 750 bis 832 und ist in Abb.2.3.3. mit III bezeichnet.

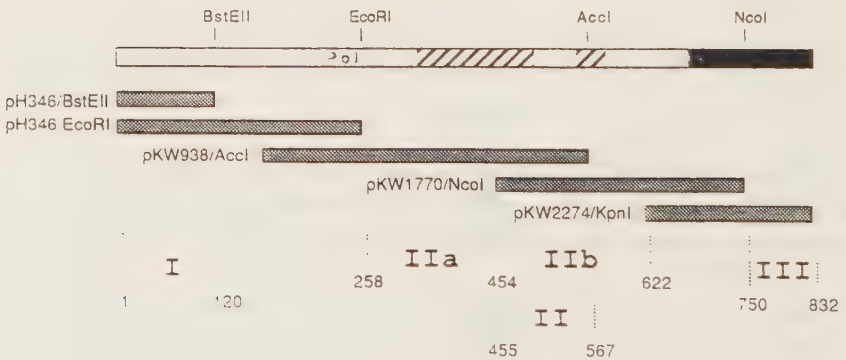


Abb.2.3.3. Schematische Darstellung der antigenen Bereiche der HBV-Polymerase. Aufgeführt sind das Pol-Protein mit den Sequenzähnlichkeiten zu reversen Transkriptasen (schraffiert) und RNaseH (schwarz), die zur Immunpräzipitation verwendeten Antigene, sowie die antigenen Bereiche I bis III mit den Aminosäurepositionen im Pol-Protein.

Diskussion

Humanseren wurden mithilfe der Immunpräzipitationstechnik auf Antikörper gegen das Pol-Protein von HBV untersucht. Sowohl in akut wie in chronisch infizierten Patienten konnten Antikörper gegen verschiedene Bereiche des Pol-Proteins nachgewiesen werden. Dies ist ein Beweis dafür, daß das gesamte Leseraster *in vivo* exprimiert wird.

In Ergänzung zu publizierten Daten konnten mindestens drei immunogene Domänen festgelegt werden, die nicht nur in der chronischen (Stemler et al., 1988), sondern bereits in der akuten Infektion nachweisbar waren. Dabei scheint der carboxyterminale Bereich, der in der vermutlichen RNaseH-Region lokalisiert wurde, ein dominantes Epitop darzustellen; Antikörper dagegen traten in 10 von 10 getesteten Seren auf. Weniger häufig waren Seren, die Antikörper gegen den aminoterminalen Bereich enthielten, hier reagierten nur 2 von 10 Seren. Stemler et al. (1988) lokalisierten mithilfe von Western Blot Analysen ein Epitop im Mittelteil der Polymerase, innerhalb der Aminosäuren 199 und 455. Die Reaktion der getesteten Seren mit pKW938/AccI und pKW1770/NcoI ließ zwei Interpretationsmöglichkeiten offen, ein diesen beiden Antigenen gemeinsames Epitop (Aminosäuren 455-567; II) oder zwei lokal getrennte Epitope, Aminosäuren 258-454 (IIa) und Aminosäuren 455-622 (IIb; Abb.2.3.3.). Zieht man die Daten von Stemler et al. hinzu, muß letztere Möglichkeit favorisiert werden, zu dem beschriebenen (Aminosäuren 199-455) und hier auf die Aminosäuren 258-454 näher eingeeengten Epitop IIa tritt das Epitop IIb, das durch die Aminosäuren 455 und 622 begrenzt wird. Beide, wie auch das amino- und carboxyterminale, müssen nun durch weitere *in vitro* synthetisierte Pol-Proteine näher eingegrenzt werden. Diskontinuierliche Epitope, die durch lokal getrennte Bereiche eines Proteins gebildet werden, können mit der verwendeten Methode nicht erfaßt werden.

Ob der Nachweis von anti-Polymerase-Antikörpern diagnostischen oder gar prognostischen Wert besitzt, muß durch Untersuchungen mit wesentlich mehr Seren und Infektionsverläufen geklärt werden.

2.4. Funktionelle Studien mit in vitro synthetisierten Pol-Proteinen

Die Virion-assoziierte DNA Polymerase-Aktivität und die bei der Replikation tätige RNA-abhängige DNA Polymerase (reverse Transkriptase) der Hepadnaviren sind vermutlich vom Pol-Raster kodiert. Erster Hinweis dafür war die von Toh et al. (1983) beschriebene Sequenzhomologie zu reversen Transkriptasen einiger Retroviren, es folgten Mutationsanalysen (Yaginuma, 1987) und Aktivitätstests (Bavand und Laub, 1987).

Durch Translation definierter Pol- und C/Pol-Proteine in vitro mit anschließender aktivierter Gelanalyse sollten die im Pol-Gen kodierte Polymeraseaktivität untersucht und Hinweise zur Expressionsstrategie gewonnen werden.

pH3093, pC3093, pH3182, pC3182 und pH346 (siehe Abb.2.1.3.) wurden um eine Genomlänge durch Insertion eines EcoRI-Fragmentes verlängert und enthielten nun das gesamte Pol-Leseraster (Abb.2.4.1.). Sollte die Polymerase durch ribosomalen Rasterwechsel entstehen, müßten pTW3093 oder pTW3182, evtl. auch pTW3093FS oder pTW3182FS als C/Pol-Fusionen, Aktivität zeigen; sollte sie durch Initiation der Translation am Pol-AUG (Pos.407) entstehen, sollte bei pTW346 Aktivität nachweisbar sein.

Die fünf Plasmide wurden mit FspI linearisiert, in vitro transkribiert und in Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert; jeweils 25µl des Lysats wurden auf ein Aktivitätsgel (Spanos und Hübscher, 1983) aufgeladen. Dieses enthielt als Substrat sogenannte 'aktivierte' DNA, Kalbsthymus-DNA mit internen freien 3'-OH-Enden und Einzelstrangbereichen. Als Kontrolle diente das Klenow-Enzym, aufgetragen jeweils 1µl einer Verdünnungsreihe bis 10⁻⁴. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in situ durch Auswaschen des SDS bei 4°C renaturiert und anschließend bei 37°C mit dem radioaktiven Vorläufer, α[³²P]dCTP, in einem für die endogene Polymerasereaktion benutzten Puffer über Nacht inkubiert. Eiskalte TCA-Lösung (5% Trichloressigsäure, 1% Natriumpyrophosphat) fixierte die Nukleinsäuren im Gel; nicht eingebaute Nukleosidtriphosphate wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Abb.2.4.1. zeigt das Autoradiogramm des nicht getrockneten Gels nach 15minütiger Exposition. Während das Klenow-Enzym auch noch in der höchsten Verdünnung Aktivität zeigte, konnten bei den in vitro synthetisierten Pol-Proteinen selbst nach wesentlich längerer Exposition des Röntgenfilms keine den verschiedenen Molekulargewichten entsprechenden Banden festgestellt werden.

So wurden zunächst folgende Berechnungen angestellt, um abzuschätzen, ob die in vitro synthetisierte Proteinmenge für eine nachweisbare Aktivität ausreichen würde, wenn ein HBV-Pol-Molekül dieselbe Aktivität hätte wie ein Klenow-Molekül. Die Pol-Proteinbande eines µl Translationsansatzes wurde mit 2.6x10⁴ dpm gemessen, was 1.2x10⁵ Pol-Molekülen entspricht. Die Ak-

tivität der 10^{-4} -Verdünnung des Klenow-Enzyms wurde von 7.8×10^{11} Molekülen verursacht. Somit enthalten die pro Gelspur aufgetragenen 25 µl eines Translationsansatzes ca. 600 mal weniger Pol-Protein als die hier verwendete 10^{-4} -Verdünnung von Klenow. Eine Aktivität wäre unter diesen Voraussetzungen nur nachweisbar, wenn erstens jedes verfügbare Pol-Molekül in optimaler Konformation vorläge, d.h. richtige Faltung in vitro und gegebenenfalls entsprechende Prozessierung, und zweitens, wenn die Polymerase nicht als C/Pol-Fusionsprotein synthetisiert wird; in diesem Fall würde die Nachweisgrenze, bedingt durch die Effizienz des Rasterwechsels, nochmals um den Faktor 30-40 sinken.

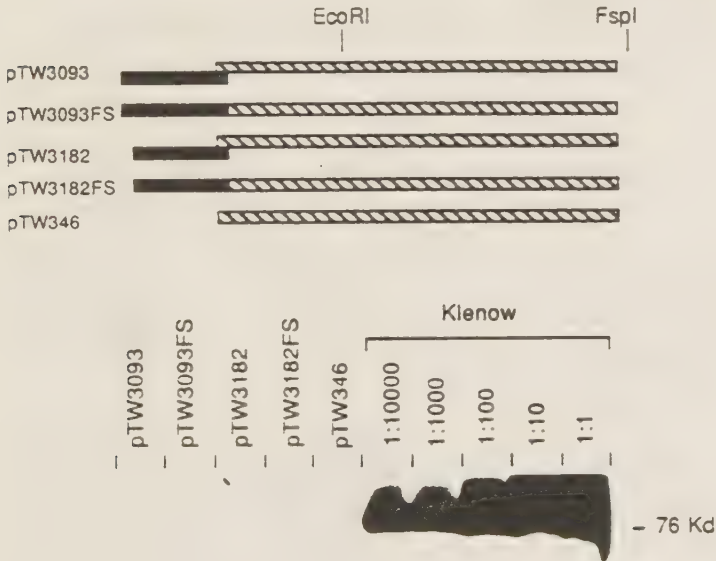


Abb.2.4.1. Aktivierte Gelanalyse. Darstellung der verwendeten Plasmide (grau: C; schraffiert: Pol) und der zur Linearisierung der Plasmid-DNA benutzten FspI-Schnittstelle. Darunter ist das Autoradiogramm des Aktivitätsgels abgebildet. Die in vitro Translationsansätze wurden zunächst auf einem 10%igen Aktivitätsgel aufgetrennt, dieses dann mit $(\alpha^{32}\text{P})\text{dCTP}$ inkubiert, gewaschen und autoradiographiert. Als Großenmarker diente das Klenow-Enzym mit 76 Kd.

Da bisher keine Berichte über in Retikulozyten- oder Weizenkeimsystemen synthetisierte aktive Polymerasen bekannt geworden sind, sollte zunächst überprüft werden, ob das hier verwendete *in vitro* Translationssystem überhaupt aktive Enzyme erzeugen kann.

Als Modellsystem wurde das Polymerase-Protein des menschlichen Immundefizienzvirus (HIV; Ratner et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985) ausgewählt. Dessen verschiedene Domänen wie Protease, reverse Transkriptase, RNaseH und Endonuklease waren bereits in verschiedenen prokaryontischen Expressionssystemen gut untersucht worden; so sind z.B. die Spaltstellen der viruskodierten Protease bekannt, die sich zuerst autokatalytisch aus dem gag/pol-Vorläufer herausprozessiert und diesen anschließend in die funktionellen Kapsid- und Pol-Proteine zerlegt (Debouck et al., 1987; Schneider und Kent, 1988; Le Grice et al., 1988; Mous et al., 1988).

Ein Teil des pol-Gens von HIV wurde in einen SP6-Vektor einkloniert und die Prozessierung des pol-Proteins *in vitro* studiert. Das Plasmid pUC18HEcoBgl(pol), das freundlicherweise von H. Wolf (Pettenkofer Institut, München) zur Verfügung gestellt wurde, enthält die Nukleotide 2094-4685 des BH10-Klons von HIV-1 (Ratner et al., 1985) in pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985). Diese wurden als PstI/EcoRI-Fragment in pSP64DH3 inseriert, einem Derivat von pSP64, dem durch S1-Nukleaseverdau die HindIII-Schnittstelle deletiert worden war, wodurch ein zur Initiation der Translation benutzbares ATG entstand (CAAGCTTGgg → cATGgg; die Erkennungssequenz für HindIII ist unterstrichen). Das Plasmid wurde pSHPP3 (Abb.2.4.2.a) benannt und enthält zwischen dem Linker-ATG und der HIV-Sequenz noch 27 Basenpaare des pUC-Polylinkers. Die Benutzung eines Fremd-ATGs war notwendig, da der normale Syntheseweg der HIV-Polymerase über einen ribosomalen Rasterwechsel von gag nach pol stattfindet und daher am 5'-Ende des pol-Leserasters ein Initiationskodon nicht notwendig und auch nicht vorhanden ist.

pSHPP3 wurde mit EcoRV und EcoRI linearisiert, *in vitro* transkribiert und im Retikulozytenlysat translatiert. pSHPP3/EcoRV enthält die Protease-Domäne inklusive der zwei zur Reifung benutzten Spaltstellen (Debouck et al., 1987), pSHPP3/EcoRI die Protease, Polymerase, RNaseH und einen Teil der Endonuklease. Beide RNAs wurden zusätzlich in Gegenwart von 0.1mM Pepstatin translatiert. Pepstatin ist ein universeller Inhibitor saurer Proteasen und hemmt in der verwendeten Konzentration die Aktivität gereinigter HIV-Protease komplett (Schneider und Kent, 1988). Abb.2.4.2.b zeigt das Ergebnis der Translationen, es sind jeweils 3µl Lysat pro Spur aufgetragen; eine Immunpräzipitation wurde wegen fehlender Protease-spezifischer Antikörper nicht durchgeführt. Es findet *in vitro* eine Selbstprozessierung beider pol-Moleküle statt; die Größe der Prozessierungsprodukte konnte aufgrund der bekannten Schnittstellen vorhergesagt werden. Neben dem unprozessierten Vorläufer von pSHPP3/EcoRV (a) sind aminoterminal (b) und carboxyterminal (c) prozessierter Vorläufer sowie reife Protease (d) zu erkennen. C komigrierte mit einem von pSHPP3/DraI translatierten Protein, dessen Carboxyterminus bis auf eine Aminosäure mit dem Carboxyterminus der reifen Protease identisch ist (Daten nicht gezeigt).

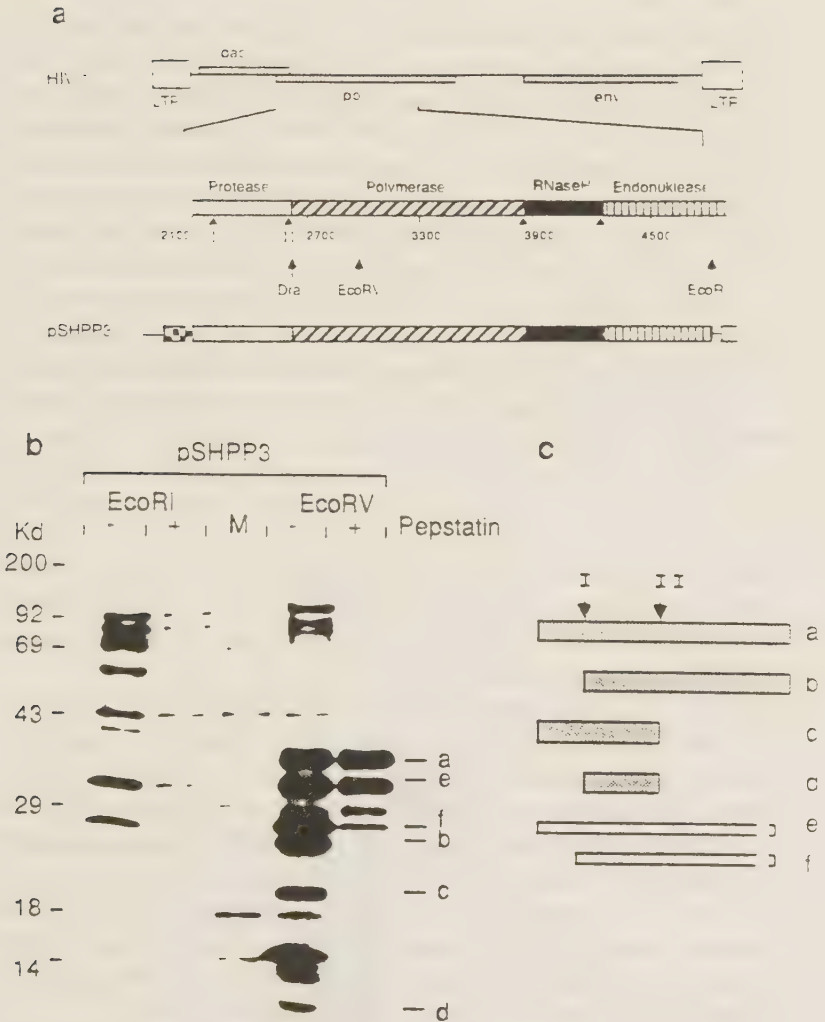


Abb. 2.4.2. a) Schematische Darstellung der Genorganisation des menschlichen Immundefizienzvirus, der Anordnung der enzymatischen Domänen des pol-Proteins und des Plasmids pSHPP3. LTR = long terminal repeat; gag, env = Strukturgene. b) Selbstprozessierung des HIV pol-Proteins. In vitro Translationen der kurzen (pSHPP3/EcoRV) und langen RNA (pSHPP3/EcoRI) wurden in Gegenwart (+) und ohne (-) Pepstatin durchgeführt. Die Proteine wurden auf einem 17,5%igen Proteingel aufgetrennt, a-f sind in c) verdeutlicht. c) Schematische Darstellung der erwarteten Prozessierungsprodukte von pSHPP3/EcoRV nach Spaltung an den beiden beschriebenen Spaltstellen.

Die Prozessierungsprodukte von pSHPP3/EcoRV sind in Abb.2.4.5.c graphisch dargestellt. Die Effizienz der Spaltung war unterschiedlich, die Prozessierung am Aminoterminus (Spaltstelle I) war etwa dreimal effizienter als am Carboxyterminus (II), das 'Endprodukt' Protease betrug nur ca.5% des Vorläufers. Die Prozessierung des langen Proteins pSHPP3/EcoRI, auf dem insgesamt mindestens vier in vivo benutzte Proteaseschnittstellen vorhanden sind, war so unvollständig, daß die Intermediate und Endprodukte nur schwer nachzuweisen waren. Hinzu kamen zwei Proteine (e und f), die das Proteinmuster noch komplizierten. Es entstand vermutlich durch vorzeitige Termination der Translation, da dieses Protein in beiden Ansätzen (pSHPP3/EcoRI und pSHPP3/EcoRV) nachweisbar war, kein internes AUG zur Initiation der Translation zur Verfügung stand und Pepstatin keinen Einfluß auf seine Synthese hatte. Es war Pepstatin-abhängig und schien aus e durch Prozessierung hervorzugehen.

Mit diesem Experiment konnte somit gezeigt werden, daß ein aktives Enzym im verwendeten in vitro Translationsystem synthetisiert werden kann, dieses aber nur einen Bruchteil der in vivo Aktivität besitzt.

Nach wie vor gibt es keine Hinweise darauf, wie die HBV-Polymerase in vivo exprimiert wird. Mögliche Synthesewege wurden bereits in Kapitel 2.1. aufgezeigt, eine möglicherweise stattfindende anschließende Prozessierung in die aktiven Domänen reverse Transkriptase und RNaseH sollten im folgenden untersucht werden.

Wie bereits in Kapitel 2.2. berichtet, konnten keine Sequenzhomologien zwischen der HBV-Polymerase und retroviralen Proteasen gefunden werden. Falls eine Prozessierung des Pol-Moleküls überhaupt stattfindet, konnten dafür a) eine Pol-kodierte, nicht durch Sequenzhomologen nachweisbare Protease, b) eine viruskodierte, aber nicht Pol-kodierte, oder aber c) eine zelluläre Protease verantwortlich sein. Miller beschrieb 1987 Sequenzhomologien des Aminoterminus von HBcAg zu Proteasen verschiedener Herkunft und diskutierte deren Beteiligung bei der Entstehung von HBcAg. Eine andere Funktion könnte die Prozessierung eines Polymerase-Vorläufers in die aktiven Domänen sein. Daher wurden, um den Einfluß von HBcAg auf ein intaktes Pol-Molekül zu untersuchen, Pol- und C-mRNAs in vitro kotranslatiert und auf Änderungen des Proteinmusters gegenüber getrennten Translationen untersucht.

PTW3182 (Abb.2.4.1.) wurde mit SspI (ca.300 Basenpaare nach dem Pol-ATG), pTW346 mit FspI (nach dem Stopkodon des Pol-Rasters) linearisiert, transkribiert, die RNAs einzeln und in Kombination in Retikulozytenlysat translatiert. Die Produkte wurden durch Immunpräzipitation mit anti-HBc- und anti-Pol-Antikörpern (anti-Pol: monoklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 73-118 der Polymerase; G. Wildner, unveröffentlicht) charakterisiert (Abb.2.4.3.).

Die RNA pTW3182/SspI dirigierte die Synthese von HBcAg (Protein a), kleineren Proteinen, die durch Initiation der Translation an internen Initiationskodons und vorzeitiger Termination der Translation erzeugt wurden, sowie eines Proteins (b), das sowohl mit α HBc- als auch mit α Pol-Antikörpern reagierte. B stellte daher ein C/Pol-Fusionsprotein dar. Bei Kotranslation mit der RNA pTW346/FspI änderte sich das Proteinmuster der Immunpräzipitation nicht. Von pTW346/FspI wurden hauptsächlich zwei Pol-Moleküle mit Molekulargewichten von 90000 (c) und 50000 (d) translatiert. C resultierte aus der Translation des gesamten Pol-Leserasters, das Molekulargewicht entspricht dem aus der Sequenz vorhergesagten. Das Laufverhalten von d wurde vermutlich von den im Eluat der Immunpräzipitation enthaltenen schweren Ketten der Immunglobuline beeinflusst; d entspricht einem aminoterminal verkürzten Pol-Protein, das durch interne Initiation der Translation am AUG bei Position 737 entstand. Bei Kotranslation mit pTW3182/SspI entstand ein zusätzliches Protein (b), das bereits erwähnte C/Pol-Fusionsprotein. Ansonsten konnte keine Änderung des Proteinmusters festgestellt werden. Somit ist ein Einfluß des Aminoterminus von HBcAg, der Ähnlichkeiten zu verschiedenen Proteasen zeigt (Miller, 1987), auf das HBV Pol-Molekül unwahrscheinlich, zumindest unter den verwendeten in vitro Bedingungen.

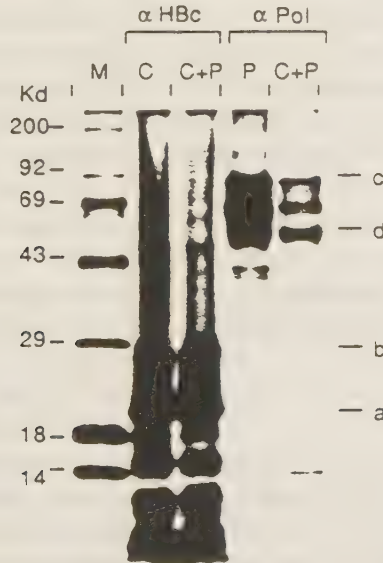


Abb.2.4.3. In vitro Translationsprodukte von pTW3182/SspI (C; siehe Abb.2.4.1.), pTW346/FspI (P) und einer Kotranslation beider RNAs (C-P), nach Immunpräzipitation mit α HBc- und α Pol-Antikörpern, Gelelektrophorese und Autoradiographie. a = HBcAg; b = C/Pol-Protein; c und d = Pol-Proteine; M = Proteingroßenstandard.

Diskussion

In diesem Kapitel sollte zunächst die im Pol-Leseraster kodierte Polymeraseaktivität durch funktionelle Studien untersucht werden. Diese Analysen wurden mithilfe der aktivierten Gelanalyse durch geführt, einer Methode zur Lokalisierung von Enzymaktivitäten in Polyacrylamidgelen. Leider reichte die im Retikulozytenlysat synthetisierte Menge an Pol-Protein vermutlich nicht aus, um eine Enzymaktivität nachweisen zu können. In Bezug auf die Darstellung von Enzymaktivitäten liegt der Vorteil der in vitro Translationssysteme in der Herstellung geringer Mengen spezifischer und durch ihre radioaktive Markierung leicht nachzuweisender Proteine, die als Substrat für exogen zugegebene Agenzien wie Proteasen (Yoshinaka et al., 1985) dienen oder auf ihre autokatalytische Wirkung hin untersucht werden können, wie das hier demonstrierte Beispiel der HIV-Protease zeigte. Studien zur Aktivität von Pol-Molekülen werden sich daher auf in Pro- oder Eukaryontenzellen exprimierte Proteine beschränken müssen, die in großen Mengen hergestellt und auch gereinigt werden können.

Als Modellsystem für die Darstellung einer Enzymaktivität in vitro wurde die Protease des pol-Proteins von HIV ausgewählt, die bereits in verschiedenen prokaryontischen Systemen hinsichtlich ihrer autokatalytischen Funktion untersucht worden war (Debouck et al., 1988; Schneider und Kent, 1988; Le Grice et al., 1988; Mous et al., 1988). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß eine aktive HIV-Protease, die sich selbst aus einem Vorläufermolekül herausprozessiert, durch in vitro Translation hergestellt werden kann. Deren Aktivität war allerdings stark eingeschränkt. In der Konstruktion, die zwei Proteaseschnittstellen enthielt, betrug das 'Endprodukt' reife Protease nur etwa 5% des Vorläufers. Da keine bestimmten Ionen für die Aktivität der Protease erforderlich sind (Schneider und Kent, 1988), könnten im Retikulozytenlysat enthaltene Faktoren einen hemmenden Effekt auf die Aktivität in vitro gehabt haben. Unwahrscheinlich ist eine teilweise aberrante Faltung des Proteins, da sich auch in E.coli hergestellte HIV-Protease komplett aus dem Vorläufer herausprozessiert (Debouck et al., 1987; Graves et al., 1988).

Ein eventueller Einfluß einer im C-Gen vermuteten Protease (Miller et al., 1987) auf das Pol-Molekül wurde durch Kotranslation von C- mit Pol-mRNAs untersucht. HBcAg zeigte im verwendeten in vitro Translationssystem keine auf das Pol-Molekül wirkende Proteaseaktivität. Studien zur Prozessierung oder Selbstprozessierung des Pol-Proteins in vitro werden durch fehlende Kenntnisse des Synthesewegs in vivo erschwert. Nur verschiedene monospezifische Antikörper, die definierte Bereiche der Polymerase erkennen, wie beispielsweise der verwendete monoklonale Antikörper, werden Aufschluß geben können über den Syntheseweg und die Prozessierung der Polymerase in vitro wie in vivo.

2.5. Abschließende Diskussion

Das Pol-Gen kodiert für ein Protein mit vielfältigen Aufgaben. Der Aminoterminus stellt wahrscheinlich das genomgebundene Protein dar (Bosch et al., 1988) und damit den Primer für die Synthese des ersten DNA-Strangs bei der reversen Transkription. Im Mittelteil ist wahrscheinlich die Domäne der reversen Transkriptase lokalisiert (Toh et al., 1983), die die Umschreibung der prägenomischen RNA in DNA durchführt. Eine genaue Analyse der zur Aktivität notwendigen Bereiche steht noch aus. Die zum Abbau der prägenomischen RNA während der Synthese des ersten DNA-Strangs notwendige RNaseH-Aktivität (Summers und Mason, 1982) ist vermutlich virus-kodiert und wird aufgrund von Aminosäure-Sequenzähnlichkeiten zu RNaseH-Molekülen von Retroviren und E.coli im Carboxyterminus des Pol-Proteins vermutet (Kapitel 2.2.).

Es bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten, die Polymerase zu exprimieren, und beide werden durch experimentelle Daten unterstützt. Der erste Weg beinhalten die Initiation der Translation am AUG des Pol-Gens und wurde durch Experimente in Zellkultur aufgezeigt (Schlicht et al., 1988). Diese Ergebnisse schließen den zweiten Weg, Rasterwechsel der Ribosomen bei der Translation nach Initiation am AUG des C-Gens und Synthese von C-Pol-Fusionsproteinen (Kapitel 2.1.), *in vivo* nicht aus; sie demonstrieren aber, daß er zur Synthese einer aktiven reversen Transkriptase nicht unbedingt notwendig ist. Die Synthese als Fusionsprotein mit Anteilen des Nukleokapsidproteins hätte mehrere Vorteile: ein durch die Effizienz des Rasterwechsels festgelegtes Verhältnis zwischen Kapsid- und Polymerasemolekülen und damit eine Kopplung an die Regulation des C-Gens, eine Verpackung der Polymerase in core Partikel mit Hilfe des Kapsidanteils, und ein möglicherweise inaktives Vorläufermolekül, das erst im Zuge der Verpackung aktiviert wird, wie dies häufig bei Retroviren der Fall ist (Krausslich und Wimmer, 1988). Die Synthese als reines Polymerase-Molekül erfordert einen anderen Verpackungsmechanismus und Pol-spezifische Regulation auf Transkriptions- oder Translationsebene. Zur Klärung der Frage, welcher Syntheseweg *in vivo* benutzt wird, bedarf es des Nachweises des oder der Pol-Proteine und gegebenenfalls deren Ansequenzierung.

Über achzig Prozent HIV-infizierter Patienten entwickeln Antikörper gegen die virale Polymerase (Di Marzo Veronese et al., 1986), die zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden können. Der Nachweis von Antikörpern gegen das Polymeraseprotein von HBV konnte sich ebenfalls zu einem weiteren diagnostischen Marker der Hepatitis B Virusinfektion entwickeln, wenn das zeitliche Auftreten dieser Antikörper mit Hilfe von Seren aus der frühen Phase der Infektion untersucht werden ist. Dabei sollte bevorzugt der Carboxyterminus von Pol als Antigen eingesetzt werden, da die Immunantwort am häufigsten gegen diesen Teil des Proteins gerichtet war.

Das Serum vieler mit Retroviren infizierter Tiere enthält Antikörper, die die enzymatische Aktivität der reversen Transkriptase hemmen (Laurence et al., 1977; Jacquemin et al., 1978; Bauer und Temin, 1980). Acht der zehn in Kap.2.3. getesteten Seren enthielten Antikörper gegen einen Bereich des HBV Pol-Moleküls, der Sequenzähnlichkeiten zu retroviralen reversen Transkriptasen aufweist (Toh et al., 1983), zehn von zehn Seren solche gegen die vermutliche RNaseH-Domäne. Diese Antikörper könnten ebenfalls die Aktivität der HBV Polymerase oder gar der RNaseH hemmen, was man sich beim Studium der Enzymaktivitäten zunutze machen könnte. Da zu erwarten ist, daß die zur enzymatischen Aktivität notwendigen Sequenzen innerhalb verschiedener Hepadnaviren oder zumindest innerhalb von Subtypen gut konserviert sind, könnte man möglicherweise mit Hilfe von Pol-spezifischen Antikörpern nach Viren mit veränderten Oberflächen- oder Nukleokapsidproteinen suchen, die mit herkömmlichen Antigen- und Antikörpertests nicht nachweisbar sind.

In einigen Fällen retroviraler Infektionen treten anti-Pol-Antikörper in Abwesenheit nachweisbarer Antikörper gegen Struktur- oder Hüllproteine auf (Wuu et al., 1977). Antikörper gegen die HBV Polymerase waren daher ebenfalls geeignet, eine Hepatitis B Virusinfektion ohne die herkömmlichen Infektionsmarker wie α HBc, HBeAg, α HBe, HBsAg und α HBs serologisch nachzuweisen.

Kapitel 3: Studien zur Expression des precore-Proteins

Das C-Leseraster, welches für das Nukleokapsidantigen (HBcAg) kodiert, enthält zwei ATG-Initiationscodons in Phase, die das Raster in eine preC-Region und das C-Gen unterteilen (Abb.2). Initiation der Translation am zweiten AUG führt zur Synthese von HBcAg, Initiation am ersten zu einem 'precore' genannten Protein (Weimer, 1987). Da die Aminosäuresequenz von preC innerhalb der Säugerhepadnaviren gut konserviert ist (Abb.3.1.), wird eine Funktion dieser Sequenz vermutet.

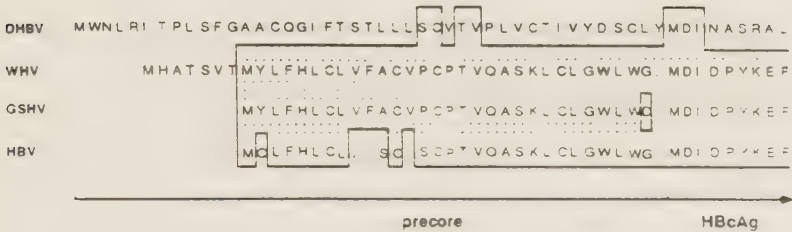


Abb.3.1. Konservierung der PreC-Region innerhalb der Hepadnaviren. Die Aminosäuresequenzen wurden von den publizierten Nukleinsäuresequenzen abgeleitet (Sprengel et al., 1985; Galibert et al., 1982; Seeger et al., 1984; Galibert et al., 1979). Umrahmt sind Aminosäuren, die in mindestens zwei Sequenzen identisch sind.

Exprimiert man precore in E.coli, entsteht ein membrangebundenes Protein mit HBe-Antigenität (Uy et al., 1986), die Expression von precore in Tierzellen führt zur Sekretion von HBeAg (Ou et al., 1986; Roosinck et al., 1986; MacLachlan et al., 1987). HBeAg ist ein während einer akuten Infektion im Serum nachweisbares, dem HBcAg verwandtes Antigen; HBcAg selbst liegt nur intrazellulär vor. HBeAg wurde als verkürzte Form von HBcAg beschrieben, dem der argininreiche Carboxyterminus fehlt (Takahashi et al., 1983). Die C-mRNA in den Hepadnaviren der Säuger ist eine am 5'-Ende heterogene Spezies (Enders et al., 1985; Möroy et al., 1985; Will et al., 1987), wobei die längeren mRNAs das preC-AUG noch besitzen. Es gibt also in vivo RNAs, die für die Translation von precore benutzt werden könnten, allerdings konnten bisher keine precore Proteine der vorhergesagten Größe in vivo nachgewiesen werden (Weimer, 1985). Ko- oder posttranslationelle Prozessierung waren eine mögliche Erklärung dafür. Alles in allem weisen die vorhandenen Daten

auf einen direkten Zusammenhang zwischen der precore-Expression und der Sekretion von HBeAg hin. Sekretierte Proteine enthalten normalerweise eine aminoterminal Signalsequenz, die für die Interaktion des entstehenden Proteins mit Membranen des endoplasmatischen Retikulums verantwortlich ist (Walter und Lingappa, 1986). Da die preC-Region reich an hydrophoben Aminosäuren ist (s.u.), könnte sie als Signalsequenz für die Ausschleusung eines precore-Proteins aus der Leberzelle fungieren, dessen weitere Prozessierung zur Entstehung von HBeAg führt. Der Nachweis der kotranslationalen Prozessierbarkeit von precore in vitro und der entsprechenden Proteine in vivo waren Ziele der nachfolgend beschriebenen Experimente.

3.1. Vergleich der preC-Regionen mit Signalpeptiden

Trotz ihrer hohen Sequenzvariabilität zeigen Signalpeptide drei konservierte Regionen, die Heijne (1985) durch Vergleich von 32 pro- und 118 eukaryontischen Signalpeptiden mit bekannter Schnittstelle herausfand. Es sind dies eine positiv geladene aminoterminal n-Region von mindestens einer bis 18 Aminosäuren Länge, eine hydrophobe h-Region mit mindestens 7, maximal 20 Aminosäuren, die durch eine polare Aminosäure unterbrochen sein können, sowie eine c-Region mit der Schnittstelle für die Signalpeptidase von in der Regel 5 bis 6 Aminosäuren. Abb.3.2.a zeigt die mittlere Hydrophobizität der von Henne untersuchten eukaryontischen Signalpeptide als Funktion des Abstandes von der Schnittstelle der Signalpeptidase. Negative Werte sind hydrophob, positive hydrophil. Der Übergang von der n- in die c-Region wird als erster Kontakt der Kurve mit der Nulllinie beschrieben, er ist in der Abb.3.2.a mit einem Pfeil gekennzeichnet. Untersucht man die preC-Sequenzen der Hepadnaviren auf ihre Hydrophobizität, stellt man zumindest für die Säugerviren ein für Signalpeptide charakteristisches Profil fest. Abb.3.2.b zeigt beispielhaft einen Hydrophilieplot (UWGCG Software, Programm PEPLOT, Vax Computer) für die preC-Region von HBV. Der theoretische h/c-Übergang ist auch hier mit einem Pfeil gekennzeichnet. Für alle preC-Sequenzen kann eine Unterteilung in n-, h-, und c-Regionen getroffen werden (Abb.3.2.c), den Ausgangspunkt für die Unterteilung stellt dabei der durch den Hydrophilieplot festgelegte h/c-Übergang dar. Die preC-Region von HBV weicht in einem Punkt von der 'typischen' Signalsequenz ab, indem mehr als eine polare Aminosäure in der h-Region vorkommt. Aufgrund der Einteilung in die n-, h- und c-Regionen wurden die Prozessierungsstellen für die Signalpeptidase vor oder hinter dem Serin in Pos.20 bei HBV, 21 bei GSHV und 28 bei WHV vorhergesagt werden. Die preC-Sequenz von DHBV erfüllt ebenfalls die Anforderungen an eine Signalsequenz, eine den Säugerviren vergleichbare Schnittstelle (Serin) findet sich allerdings erst in der core-Sequenz (5. Aminosäure nach dem Methionin von DHBcAg).

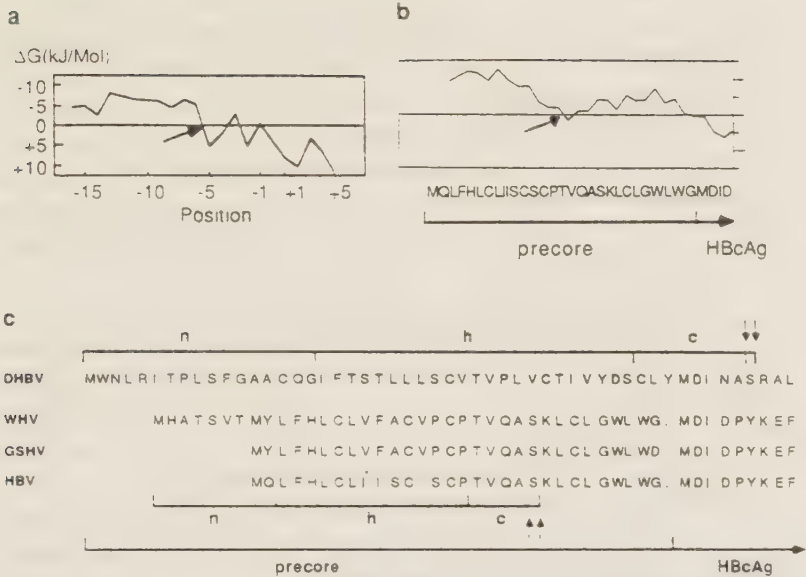


Abb.3.2. Vergleich der preC-Region mit Signalpeptiden. a) Mittlere Hydrophobizität eukaryontischer Signalpeptide als Funktion des Abstandes von der Schnittstelle der Signalpeptidase (Heijne, 1985). Der Übergang der h- in die c-Region ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. b) Hydrophilieprofil der preC-Region von HBV. Der Pfeil kennzeichnet den theoretischen h/c-Übergang. c) Unterteilung der hepadnaviralen preC-Sequenzen in eine aminoterminal (n), hydrophobe (h) und carboxyterminale (c) Region. Die aufgrund dieser Einteilung vorhergesagten Spaltstellen für die Signalpeptidase sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.2. Prozessierung des precore-Proteins in vitro

Der experimentelle Ansatz zur Untersuchung, ob die precore-Region als Signalpeptid dient und kotranslational abgespalten wird, bestand in der Herstellung von preC- und C-spezifischen mRNAs und deren Translation in vitro in Gegenwart mikrosomaler Membranen als Lieferanten des endoplasmatischen Retikulums. Abb.3.3.a zeigt einen Ausschnitt aus der Genorganisation von HBV und die vom C-Leseraster translatierbaren Proteine. Abb.3.3.b die Konstruktion der verwendeten Plasmide zur in vitro Transkription. Die gesamte preC/C-Region (Plasmid pH3095) bzw. das C-Gen alleine (pH3177) wurden bis zur EcoRI-Schnittstelle bei Pos. 1280 in das Plasmid pSP64 (Melton et al., 1984) inseriert (Weimer, 1985).

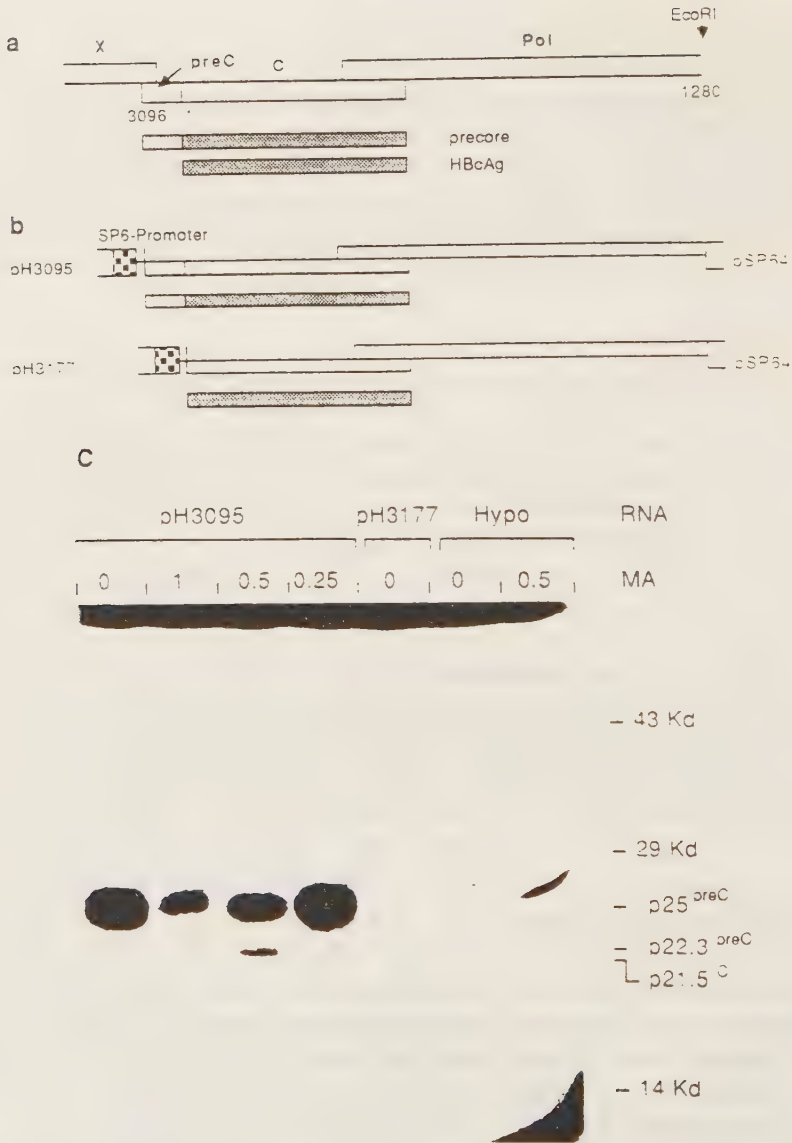


Abb.3.3. Kotretranslationale Prozessierung von precore. a) Ausschnitt aus der Genorganisation von HBV mit den vom C-Leseraster translatierbaren Proteinen precore und HBcAg. b) Konstruktion der Plasmide pH3095 und pH3177 in pSP64 und die von den jeweiligen RNAs translatierten Proteine. c) In vitro Translation der RNAs pH3095/EcoRI und pH3177/EcoRI in Gegenwart verschiedener Membrankonzentrationen (MA). Als Prozessierungskontrolle diente eine mRNA aus der Hypopnycse (= Hypo). MA = Anteil der Membranen am Translationsansatz [μ l].

In vitro Transkription mit SP6-RNA-Polymerase führte zu mRNAs mit koterminalen 3'-Ende (die Plasmide wurden mit EcoRI linearisiert), aber unterschiedlichen 5'-Enden, die vor dem Initiationskodon für preC (pH3095) bzw. für C (pH3177) liegen. Zum Studium kotranslationaler Prozessierung wurden diese mRNAs in kommerziell erhältlichem Kaninchen-Retikulozytenlysat zusammen mit Membranpräparationen aus Hundepankreas translatiert. Als Prozessierungskontrolle diente das Translationsprodukt einer Hypophysen-mRNA, dessen Signalpeptid in Gegenwart von Mikrosomen abgespalten wird und dessen Molekulargewicht sich dadurch um 3000 verringert. Das Ergebnis der in vitro Translation ist in Abb.3.3.c zu sehen.

Die Translation der preC-mRNA pH3095 führte ohne Membranen (MA=0) zur Synthese des precore-Proteins mit einem Molekulargewicht von 25000 [p25^{prec}]. In Gegenwart von Mikrosomen fand eine Prozessierung des precore-Proteins statt, es entstand ein Protein von 22,3 Kilodalton [p22,3^{prec}], das eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität als das von pH3177 translatierte core-Protein [p21,5^c] besaß. Das bedeutet, daß die Prozessierung innerhalb der precore-Region stattfinden muß und p22,3^{prec} aus p21,5^c plus zusätzlichen aminoterminalen Aminosäuren der precore-Sequenz besteht. Die Prozessierung war in hohem Maße von der Membrankonzentration abhängig; ein hoher Membrananteil (MA = 1) verringerte die Translationseffizienz um etwa den Faktor 2-3 und zeigte keine prozessierende Aktivität. Ein niedriger Membrananteil (MA = 0,25) beeinflusste zwar die Translationseffizienz nicht, prozessierte allerdings nur ca. 0,5% des precore-Proteins. Nur ein intermediärer Membrananteil von 0,5 µl/25 µl Translationsansatz (MA = 0,5) führte zu einer deutlich sichtbaren Prozessierung von precore; die Prozessierung des Kontrollproteins (RNA = Hypo) war dabei fast vollständig. Die Prozessierung geschah kotranslational. Zumischen von Membranen nach der Translation veränderte das Proteilmuster nicht.

3.3. Precore-Proteine in chronisch WHV-infizierten Marmosetlebern

Am 5'-Ende des C-Leserasters von WHV befinden sich drei Initiationscodons in Phase, die zur Synthese von zwei precore-Proteinen mit einem errechneten Molekulargewicht von 25700 und 25200 sowie einem WHcAg Protein von 21600 dienen können (Abb.2). Bei der Untersuchung der C-Genexpression auf Proteinebene durch Western Blot Analyse von Marmosetlebern mit einem Antiserum gegen bakteriell exprimiertes WHcAg (siehe Kapitel 1.1.) ergab sich der in Abb.3.4. gezeigte Befund. In chronisch WHV-infizierten Lebern wurden neben dem Nukleokapsidantigen, das in der SDS-Gelelektrophorese in der Position von 20,5 Kd lief (Abb.3.4., Protein c), zwei weitere Proteine mit 27 (a) und 22,5 Kd (b) durch das Antiserum nachgewiesen. Die elektrophoretische Mobilität der WHV core-Proteine a, b und c ist dem Laufverhalten von in vitro

synthetisierten p25^{prec}, p22.3^{prec} und p21.5^c von HBV sehr ähnlich. Daneben konnte a einem unprozessierten, b einem aminoterminal prozessierten precore-Protein von WHV entsprechen.

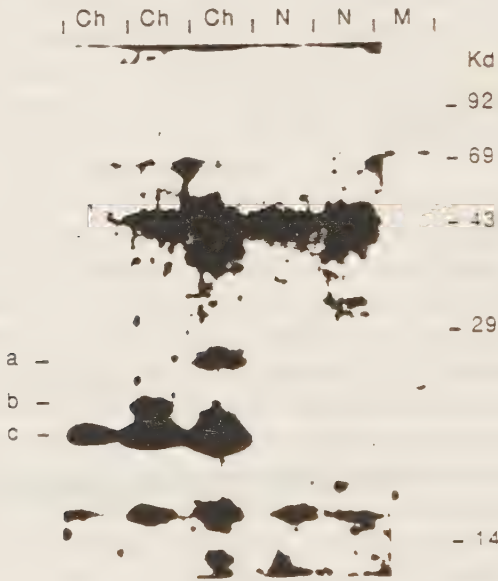


Abb.3.4. Nachweis von WHcAg (c) und vermutlich unprozessiertem (a) und aminoterminal prozessiertem (b) precore von WHV in Lebern chronisch WHV infizierter Marmosetiere. Leberextrakte chronisch (Ch) und nicht (N) infizierter Marmosetiere wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit α WHc-Antikörpern (Abb.1.1.) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden durch 125 I-Protein A und anschließende Autoradiographie sichtbar gemacht. M = Proteingrößenstandard.

Diskussion

Bisher ist noch kein precore-Protein in Hepadnavirus-infizierten Lebern beschrieben worden. Dennoch gibt es mehrere Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung der preC-Region *in vivo*. Expression und Sekretion von HBeAg, dessen Auftreten im Serum mit aktiver viraler Replikation korreliert, hängt *in vitro* und *in vivo* vom Vorhandensein einer preC-Sequenz ab (Ou et al., 1986; Roossinck et al., 1986; Chang et al., 1987; Schlicht et al., 1987).

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß preC als Signalpeptid fungierte und das entstehende precore-Protein an die Membran dirigierte. Die anschließende kotranslationale Prozessierung führte zu einem Protein, das als p22,3^{preC} bezeichnet wurde und eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität als das Nukleokapsidantigen HBcAg besaß. Dies läßt auf eine Prozessierung innerhalb der preC-Sequenz schließen, was auch durch Vergleich mit Signalpeptiden bekannter Schnittstelle vorhergesagt wurde. Inzwischen sequenzierten Strandberg et al. (1987) p22,3^{preC} und legten dessen Aminoterminus auf das Serin bei Pos.20 fest. Nach der Abspaltung des Signalpeptids müssen weitere Proteaseaktivitäten zur Prozessierung von p22,3^{preC} zu HBcAg gefordert werden, dabei könnte eine Aspartylprotease involviert sein (Jean-Jean et al., 1988). Der Nachweis von nicht und aminoterminal prozessierten precore-Proteinen in WHV-infizierten Lebern zeigte erstmals auf direktem Weg die Expression von precore in vivo. Die Nachweisbarkeit solcher Proteine in WHV-, aber nicht in HBV-infizierten Lebern könnte auf den wesentlich höheren Prozentsatz an preC-Transkripten bei der WHV-Infektion (Möröy et al., 1985; Will et al., 1987) und eine dadurch erhöhte Zahl an precore Proteinen, oder eine unterschiedliche Regulation der precore Expression zurückzuführen sein. Der Nachweis von aminoterminal prozessiertem, aber nicht sekretiertem precore in vivo erfordert einen Mechanismus, der es einem bereits mit der Membran assoziierten Protein nach Abspaltung der Signalsequenz erlaubt, ins Cytoplasma zurückzukehren. Ein solcher wurde mittlerweile für das precore Protein von HBV beschrieben (Garcia et al., 1987).

In vitro Translationssysteme - ein Resumee

In vitro Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysats wurde bereits für vielfältige Aufgabenstellungen herangezogen, beispielsweise zur Analyse der Genprodukte viraler (Philipson et al., 1978; Joshi et al., 1984; Gordon et al., 1988) und zellulärer RNAs (Gronemeyer et al., 1987), zur Untersuchung von Signalpeptiden (Zerial et al., 1987), zum Nachweis und der Analyse von ribosomalen Rasterwechseln (Jacks and Varmus, 1985; Jacks et al., 1987, 1988, 1988a), zur Untersuchung der Translationsinitiation in Pflanzen und Tieren (Lutcke et al., 1987), und zur Herstellung von Substrat zum Nachweis von Enzymaktivitäten (Krausslich et al., 1988) und Antikörpern (Persing et al., 1986a). Bei diesen und anderen Studien (Kozak, 1988) wurden Vor- und Nachteile von in vitro Translationssystemen deutlich, die auch Einfluß auf die Ergebnisse dieser Arbeit hatten. Sie sollen im folgenden erörtert werden.

Initiation der Translation an internen AUGs ist einer der häufig beschriebenen Nachteile des Retikulozytenlysats (zur Übersicht Kozak, 1988). Dies konnte auch in vielen der hier durchgeführten Experimente beobachtet werden, beispielsweise die Initiation am Pol-AUG auf einer preC-mRNA (Kapitel 2.1.), 500 Nukleotide 3' vom 5'-Ende der RNA. Die interne Initiation stellte hier insofern einen Nachteil dar, daß keine Rückschlüsse auf die Situation in vivo möglich waren, insbesondere bei der Entscheidung, ob ein Rasterwechsel oder interne Initiation am Pol-AUG zur Expression der Polymerase führen. Vorteilhaft waren durch interne Initiation entstandene Proteine beim Nachweis von Antikörpern, wie er in Kapitel 2.3. durchgeführt wurde. Damit konnten gleichzeitig Antikörper nachgewiesen werden, die gegen verschiedene Antigene oder Genprodukte eines Leserasters gerichtet sind, die sich am Aminoterminal unterscheiden.

Dem Problem der internen Initiation kann teilweise durch die Verwendung eines anderen in vitro Translationssystems, dem Weizenkeimextrakt, begegnet werden. Er soll die Translation nur an den authentischen, d.h. in vivo benutzten Startkodons initiieren (Kozak und Shatkin, 1977; Zerial et al., 1987). Demnach wurde das Pol-AUG in vivo auf der C-mRNA nicht benutzt werden. Es wären aber auch die internen AUGs des C-Gens in vivo funktionell, was einer genaueren Untersuchung bedarf.

Ein Problem bei der Interpretation von Ergebnissen stellte die in Kapitel 2.1. beobachtete Assoziation in vitro synthetisierter Polypeptide mit tRNA dar. Sämtliche in dieser Arbeit translatierten Pol- und C-Pol-Proteine lagen zum Teil als Peptidyl-tRNA vor, wenn sie von mRNAs ohne Stop-kodon im Pol-Raster exprimiert wurden. Dies traf nicht auf Produkte des C-Gens, des WHs-Gens (Kapitel 1.1.) und auch nicht auf Translationsprodukte der hepatischen Triglyceridlipase (Stahnke, unveröffentlicht) zu. Das schließt eine Verarmung der Lysate an Hydrolasen aus, zumal die tRNA-

Assoziation reproduzierbar in unterschiedlichen Retikulozytenpräparationen auftrat. Im Weizenkeimextrakt liegen 40-50% der Proteine, deren Translation nicht an einem Stopkodon terminierte, als Peptidyl-tRNA vor (Haeuptle et al., 1986). Das bedeutet, sofern man einen gleichen Prozentsatz für Retikulozytenlysat voraussetzt, daß in einigen Proteinen (z.B. pC3182M/BstEII und /BamHI, Kapitel 2.1.) nur minimale Hydrolaseaktivität stattgefunden haben kann. Da alle diese Proteine mit verschiedenen Aminosäuren enden, ist eine spezifische tRNA und/oder Aminosäure als Ursache auszuschliessen. Vielmehr scheint die Struktur der Pol-Moleküle eine Rolle zu spielen und eine effiziente Spaltung der Esterbindung zwischen tRNA und carboxyterminaler Aminosäure zu verhindern.

Die Klonierung von Genen und Genabschnitten in zur in vitro Transkription geeignete Vektoren mit anschließender Translation dieser Transkripte in Retikulozytenlysat stellt ein System zur Produktion definierter Antigene dar. Diese können in nativer Form zum Nachweis von Antikörpern eingesetzt werden, zur Diagnose, zur Überprüfung einer Immunisierung (Kapitel 1.1.), oder auch zum indirekten Nachweis der Expression eines bestimmten Gens in vivo (Kapitel 2.3.). Dabei besteht durch die radioaktive Markierung der Antigene eine hohe Sensitivität; diese muß noch durch Titration eines bekannten Serums quantifiziert werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte, so daß mehrere Antigene gleichzeitig zur Überprüfung eines Immunstatus eingesetzt werden können. Die im Anhang beschriebenen und in den Kapiteln 1.1. und 2.3. verwendeten Derivate von pSP64 und pSP65 bieten die Möglichkeit, Genfragmente effizient zu exprimieren, die kein Initiationskodon enthalten. Dadurch wird die Anwendbarkeit des Systems verbessert, gerade in Bezug auf die Expression unterschiedlicher Bereiche eines Gens zur Lokalisierung antigenen Determinanten.

Der Nachweis enzymatischer Aktivitäten in vitro exprimierter Proteine ist nur bedingt möglich (Kapitel 2.4.). Sollen exogene Substrate umgesetzt werden, empfiehlt sich wegen der geringen im Lysat produzierten Proteinmenge die Verwendung anderer, pro- oder eukaryontischer Expressionssysteme. Sinnvoll erscheint die Analyse autokatalytischer Prozesse. Hier spielt weniger die Quantität eine Rolle, sondern die Sensitivität, mit der die anfallenden Prozessierungsprodukte nachgewiesen werden können. Diese ist durch die radioaktive Markierung der in vitro Translationsprodukte gegeben, wie das Beispiel des pol-Vorläufers von HIV zeigte (Kapitel 2.4.). Die Eignung in vitro exprimierter Proteine als Substrat für exogen zugegebene Enzyme wurde bereits für das Rinderleukämievirus (BLV; Yoshinaka et al., 1986) und HIV (Kräusslich et al., 1988) unter Beweis gestellt. Hier dienten gag Proteine, die in Retikulozytenlysaten translatiert worden waren, als Substrat für die in E.coli exprimierten Virusproteasen.

Ribosomale Rasterwechsel bei der Expression von Fusionsproteinen eukaryontischer Viren sind wegen der radioaktiven Markierung der Genprodukte relativ einfach nachweisbar, wenn die Initiation der Translation am AUG des ersten Leserasters effizient erfolgt und hochtitrige Antisera gegen beide Fusionspartner zur Verfügung stehen.

Die Effizienz der Rasterwechsel im Retikulozytenlysat war in allen bisher untersuchten Fällen mit der in vivo beobachteten vergleichbar (Jacks et al., 1985, 1987, 1988; Clare et al., 1988). In Kapitel 2.1. wurde eine gegenüber dem Retikulozytenlysat um das Fünffache reduzierte Effizienz im Weizenkeimextrakt festgestellt, die auch beim Rasterwechsel von F1 nach F2 des infektiösen Bronchitisvirus beobachtet worden war (Brierley et al., 1987). Werden im Pflanzensystem die Signale zum Rasterwechsel deshalb schlechter erkannt, weil Unterschiede in den Translationsbedingungen oder Ribosomenstrukturen bestehen? Künftige Experimente mit Transposons, die kürzlich aus der Kruzifere *Arabidopsis thaliana* isoliert wurden und in ihrer Genorganisation dem Hefetransposon Ty912 ähneln (Voytas und Ausubel, 1988), könnten zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

Material

A. Biologisches Material

Nukleinsäuren

Plasmide

- pSP64, pSP65 Melton et al., 1984
- pEx30 a, b, c Derivate von pPlc24 (Remaut et al., 1984), konstruiert von E.Beck, Heidelberg (Strebel et al., 1985)
- pUC18HEcoBgl(Pol) H.Wolf, unveröffentlicht. In pUC18 sind die Nukleotide 2094-4685 des BH10-Klons von HIV-1 (Ratner et al., 1985) inseriert

Oligonukleotide

- CFS1 (HBV 430-467)
5'-CCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCC'-
- CFS2 (HBV 467-434)
5'-CCGAGGGGACCTGCCTCGTCTAACAACAGTAGTCT'-
- CFS3 (HBV 464-503)
5'-CCGCCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTC'-
- CFS4 (HBV 503-464)
5'-CCGAGACCTTCGTCTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTTAGGGG'-
- CFS5 (HBV 500-533)
5'-CCGGGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATC'-
- CFS6 (HBV 537-500)
5'-CCGAGATTGAGATCTTCTGCGACGCGGCGATTGAGACC'-
- R1H3link1 5'-AATTGGTACCATGGATCCCGGGAGCTCA'-
- R1H3link2 5'-AGCTTGAGCTCCCGGGATCCATGGTACC'-
- R1H3link3 5'-AGCTTGATATCGATGCATCGAATTCTGCAGATCTCG'-
- R1H3link4 5'-AGCTCGAGATCTGCAGAATTCGATGCATCGATATCCA'-
- HBV366TGA 5'-CGGAGTGTGAATTCGCACTCC'-
- HBV394ATA 5'-TATAGACCACCAAATACCCCTATCCTATCAACACTT'-
- HBV422TAG 5'-CAACACTTCCGTAGACTACTG'-
- HBV465TGA 5'-CCCTAGAAGATGAACTCCC'-
- HBV511TGA 5'-CCGCGTCGCTGAAGATCTC'-

- HBV542TTG 5'-CTCAATGTTTGTATTCCTTGG-3'
- HBV367 (HBV367-386) 5'-GGAGTGTGGATTCGCACTCC-3'
- SP6TW (SP6-Promoter) 5'-CACATACGATTTAGGTGACAC-3'
- MS2-Oligo (MS2-Replikase) 5'-GGTCAGATAAATAGAGAAGG-3'
- pBR2094 5'-CCGTCATCACCGAAACGCGCG-3'

Sonstige und Nukleosidtriphosphate

- Kalbsthymus-DNA, Boehringer Mannheim
- Desoxyribonukleosidtriphosphate, 100mM-Lösung, HPLC-gereinigt, Boehringer Mannheim
- Ribonukleosidtriphosphate, 100mM-Lösung, HPLC-gereinigt, Pharmacia, Freiburg
- ³mG(5')ppp(5')G (cap-Nukleotid), Pharmacia, Freiburg

Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden bei wechselnden Anbietern wie United States Biochemicals, Cleveland, USA; Pharmacia, Freiburg; Gibco-BRL, Eggenstein; New England Biolabs, Schwalbach; Amersham Buchler, Braunschweig und Boehringer Mannheim bezogen. Schneidepuffer wurden nach den Beipackzetteln angesetzt oder wie mitgeliefert verwendet.

Sonstige Enzyme

- Bal31, 500Units/ml, New England Biolabs
- CIP, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, 1Unit/μl, Boehringer Mannheim
- DNaseI, RNase-frei, 23Units/μl, Boehringer Mannheim
- Endoglykosidase F, Boehringer Mannheim
- Klenow-Enzym (großes Fragment der DNA-Polymerase I aus E.coli), 5Units/μl, United States Biochemicals
- Lysozym (Muramidase) aus Hühnereiweiß, kristallisiert, Boehringer Mannheim
- Phosphodiesterase I, Boehringer Mannheim
- ProteaseK, lyophilisiert, Boehringer Mannheim
- RNaseA, lyophilisiert, Boehringer Mannheim

- S1 Nuklease, 53Units/ μ l, Pharmacia, Freiburg
- Sequenase™, 12.5Units/ μ l, United States Biochemicals
- SP6 RNA Polymerase, 10Units/ μ l, New England Biolabs
- T4 DNA Ligase, 5-8 Weiss-Units/ μ l, Pharmacia
- T4 Polynukleotidkinase, 10Units/ μ l, New England Biolabs

Proteine

- α_2 -Makroglobulin, Boehringer Mannheim
- RNasin™, RNase-Inhibitor, Promega Biotec, über Genofit, Heidelberg
- Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Sigma, Deisenhofen
- Pepstatin, Boehringer Mannheim

Kits und in vitro Translationssysteme

- Multiprime labelling kit, Amersham Buchler, Braunschweig
- Nick translation kit, Amersham Buchler, Braunschweig
- Sequenase™ Sequencing kit, United States Biochemicals, Cleveland, USA
- Didesoxysequencing kit (Klenow), New England Biolabs
- Kaninchen Retikulozytenlysat, Promega Biotec L4210,
- Weizenkeimextract, Promega Biotec L4380, beide bezogen über Genofit, Heidelberg
- Protein-Translations- und Prozessierungssystem NEK-019, New England Nuclear, Dreieich

Antiseren

- α 83: Kaninchenantiserum gegen ein β -Lactamase-HBcAg-Fusionsprotein (Stahl et al., 1982)
- α 24W30: Kaninchenantiserum gegen die Aminosäuren 128-174 des WHV PreS-Proteins. exprimiert als MS2-Fusionsprotein (Will, 1986, unveröffentlicht)
- α WHc: Kaninchenantiserum gegen die Aminosäuren 4-188 von WHcAg, exprimiert als MS2-Fusionsprotein (Salfeld, 1985)
- α GSHc: Kaninchenantiserum gegen die Aminosäuren 4-187 von GSHcAg, exprimiert als MS2-Fusionsprotein (Salfeld, 1985)

- α 59/3: Kaninchenantiserum gegen die Aminosäuren 77-175 von HBcAg, exprimiert als MS2-Fusionsprotein (E.Pfaff, unveröffentlicht)

Bakterienstämme und Bakteriophagen

- E.coli 537 ist ein C600-Stamm ($m^- r^- thr^- leu^- pro^- supE$, mit plasmidkodierter temperatur-sensitiver Mutante des CI Repressorgens des Phagen Lambda (cI857, Küpper 1983). Die Selektion des Plasmids erfolgt durch Kanamycin.
- E.coli 2136 trägt das CI Repressorgen chromosomal integriert
- E.coli JM105 ist $thi^- rpsL^- endA^- sbcB15^- hspR4^- \Delta$ (lacproAB)/F' traD36 proAB lacI^qZ Δ M15 $r^- m^-$ (Yanisch-Perron et al., 1985).
- E.coli WK6 Δ (lac-proAB),galE,stra/F'laqI^q,Z Δ M15, proA⁻B⁺ (Kramer und Fritz, 1986)
- E.coli WK6mutS Δ (lac-proAB),galE,stra, mutS215::Tn10 Δ F'laqI^q,Z Δ M15,proA⁻B⁺ (Stanssens et al., 1986)
- M13KO7 Pharmacia, Freiburg

Kulturmedien

- Standard I Nährbouillon (StI), Merck&Co., Darmstadt
- Standard I Platten: StI Nährbouillon mit 1.5% Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
- Zur Selektion werden 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin verwendet.
- M9 Minimalmedium: 7g NaHPO₄, 3g KH₂PO₄, 1g NH₄Cl, 25ml 20% Glucose, 1ml 100mM CaCl₂, 1ml 1M MgSO₄, 5ml 100 μ M FeCl₃, 1mg Thiamin, 15g Bacto-Agar, H₂O ad 1l.

B. Radiochemikalien

wurden von Amersham Buchler, Braunschweig bezogen

- [α -³²S]dATP: SJ.304, 600Ci/mmol
- [γ -³²P]ATP: PB.144, 3000Ci/mmol
- [α -³²P]dGTP: PB.10206, 3000Ci/mmol
- [α -³²P]dCTP: PB.10205, 3000Ci/mmol
- L-³⁵S-Methionin: SJ.204, 800Ci/mmol
- ¹²⁵I-ProteinA: IM.144, > 30mCi/mg

- ¹⁴C-methylierte Proteinmischung:

- CFA.626 Amersham Buchler, Braunschweig
- 560-6021, Gibco-BRL, Eggenstein

Myosin (H-Kette)	200000d
PhosphorylaseB	92000d
Rinderserumalbumin	69000d
Ovalbumin	43000d
Carboanhydrase	29000d
β-Lactoglobulin (nur Gibco)	18400d
Lysozym	14300d
Spezifische Aktivität: 5-30μCi/mg Protein	

C. Chemikalien

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH&Co., Darmstadt
- Serva Feinbiochemika GmbH&Co., Heidelberg
- Riedel-de Haën AG, Seelze
- Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm
- Merck GmbH, Darmstadt
- Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Spezielle Chemikalien und Artikel:

- Agarose, Gel electrophoresis Grade, BRL, Eggenstein
- Acrylamid, reinst. und 4xkrist., Serva, Heidelberg
- Acrylamid, ultrarein f. Sequenzgele, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Ampicillin, Boehringer Mannheim
- Bromphenolblau, Merck, Darmstadt
- Coomassie Brilliant Blue R, Sigma Chemie, Deisenhofen
- Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma, Deisenhofen
- Dithioerythrol (DTE) und Dithioerythrit (DTT), Serva, Heidelberg
- Ethidumbromid, Boehringer Mannheim
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und deren Na-Salz, Merck, Darmstadt
- Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetat (EGTA), Merck, Darmstadt
- Freund's Adjuvans, complete und incomplete, Behringwerke AG, Marburg
- Haftsilan, Wacker-Chemie München

- Kanamycinsulfat, Boehringer Mannheim
- N,N'-Methylenbisacrylamid, Serva, Heidelberg und ultrarein Bio-Rad, München
- N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva, Heidelberg
- Nitrocellulosefilter BA85, Schleicher&Schüll, Darmstadt
- Nonidet P40 (NP40), Fluka, Neu-Ulm
- Orange G, Fluka, Neu-Ulm
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Serva, Heidelberg
- Polyethylenglykol 6000, Serva, Heidelberg
- PonceauS, Serva, Heidelberg
- ProteinA-Sepharose CL-4B, Pharmacia, Freiburg
- Repelcote (Dimethyldichlorsilan), BDH Ltd., Poole, England
- Röntgenfilme Kodak X-Omat XAR25, Eastman Kodak, Rochester, USA
- Sephadex G25, G100, Pharmacia, Freiburg
- Sodiumdodecylsulfat (SDS), Serva, Heidelberg
- Spermidin, Boehringer Mannheim
- Tricine [N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin], Serva, Heidelberg
- Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], Merck, Darmstadt
- Whatman 3MM und DE81 Chromatographiepapier, Whatman Ltd., Maidstone, England
- Xylencyanol FF, Fluka, Neu-Ulm

Methoden

Transformation von E.coli

Zur Transformation von extrachromosomaler DNA in E.coli wird die von Cohen et al. (1972) beschriebene und von Herrmann et al. (1980) modifizierte CaCl_2 -Methode verwendet.

a) Herstellung kompetenter Zellen

StandardI-Medium wird im benötigten Volumen (4ml/Transformation) 1:100 bis 1:200 mit einer Übernachtskultur E.coli angeimpft und diese bei geeigneter Temperatur (in der Regel 37°C) bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($1\text{-}2 \times 10^8$ Zellen/ml) geschüttelt. Die Zellen werden sodann abzentrifugiert (3 min., 8000rpm, Sorvall RC2B), in 1/2 Kulturvolumen eiskalter 30mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min., 5000rpm) und Resuspendierung in 1/20 des Kulturvolumens werden die Bakterien bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

b) Transformation

0.01-0.25 pmol DNA in TENT-Puffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM NaCl, 30mM CaCl_2 , 1mM EDTA; Endvolumen 100µl) werden mit 200µl kompetenten Zellen 30 min. auf Eis inkubiert. Nach 4-minütigem Wärmeschock bei 37°C werden die Zellen in 1ml StI-Medium 45-60 min. bei geeigneter Temperatur aufgewachsen, um die plasmidkodierte Resistenz zu exprimieren. Nach kurzem Abzentrifugieren (10sec.) resuspendiert man die Zellen in 100µl StI-Medium und streicht sie auf Antibiotikaplatten aus. Die Transformationseffizienz liegt normalerweise bei 10^{-4} - 10^{-6} .

Plasmidpräparationen

a) RAPP (rapid alkaline plasmid preparation)

Dieses Verfahren ist modifiziert nach Ish-Horowicz und Burke (1981). Die angegebenen Werte gelten für 1,5ml [200ml] Kulturen.

Die unter Selektion kultivierten Bakterien werden 15sec. in der Tischzentrifuge [10 min. 8000rpm Sorvall RC2B] abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100µl [7ml] SolA (50mM Glucose, 25mM

Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA) resuspendiert und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150µl [14ml] SolB (0,2M NaOH, 1% SDS) wird 5 min. auf Eis inkubiert; durch Zugabe von 120µl [10,5ml] eiskalter SolC (3M Natriumacetat, 2M Essigsäure) und kräftiges Mischen flocken nun Proteine, zelluläre DNA und größere Zellbestandteile aus. Diese werden nach 5-minütiger Inkubation auf Eis abzentrifugiert. Der Überstand wird mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, Ethanol gefällt (wegen des hohen Salzgehalts von 0,8M Natriumacetat geschieht dies bei Raumtemperatur) und in geeignetem Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute variiert zwischen 5µg Plasmid-DNA pro ml Kultur bei Plasmiden mit hoher Kopienzahl wie den SP6-Vektoren und 0,5µg DNA/ml Kultur bei solchen mit niedriger Kopienzahl wie den pEx-Vektoren.

b) Schnellmethoden

Sollen bei einer Klonierung viele Plasmide nur auf ihre Größe überprüft werden, empfehlen sich die beiden folgenden Verfahren der DNA-Extraktion, die allerdings nicht selektiv sind für episomale DNA.

- 500µl der unter Selektionsdruck aufgewachsenen Bakterienkultur werden in der Tischzentrifuge 15 sec. abzentrifugiert. Der Medienüberstand wird bis auf einen kleinen Rest dekantiert, die Bakterien durch Zugabe von 3 Tropfen Phenol aus einer Pasteurpipette und kräftiges Mischen aufgeschlossen. 5 minütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge ergeben dann einen trüben Überstand von ca. 20µl. Die Hälfte davon wird, mit nativem Farbmarker versetzt, der 1mg/ml RNaseA enthält, auf einem Agarosegel analysiert.
- 500µl der unter Selektionsdruck aufgewachsenen Bakterienkultur werden in der Tischzentrifuge 15 sec. abzentrifugiert. Der Medienüberstand wird vollständig dekantiert, das Pellet in 100µl Cracking Puffer (50mM Tris-HCl pH6,8, 1% SDS, 2mM EDTA, 0,4M Sucrose, 0,01% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol FF, 0,02% Orange G, 250µg/ml RNaseA) resuspendiert. Durch fünfminütiges Schütteln der Proben auf dem Eppendorfschüttler werden die Bakterien aufgeschlossen. Im Anschluß an eine 15 minütige Zentrifugation werden 25µl des Überstandes auf einem Agarosegel analysiert.

Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugation

Plasmid-DNA, die z.B. zur in vitro Transkription verwendet werden soll, muß von bakterieller RNA, die nach einem RAPP noch vorhanden ist, gereinigt werden. Zu diesem Zweck werden die DNA, 4,11g Cäsiumchlorid (CsCl) und 100µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) im

Gesamtvolumen von 5.5ml in einem Vertikalrotor (Beckman VTi 65) über Nacht bei 50000rpm zentrifugiert. Die Plasmidbande wird mit schwachem ultraviolettem Licht (366nm) sichtbar gemacht und mittels einer Kanüle abgezogen. Das Ethidiumbromid wird durch mehrmaliges Ausschütteln mit CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt, das CsCl durch Dialyse in TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA) ausverdünn.

Phenol- und Chloroformextraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen werden diese mit gleichem Volumen gepuffertem Phenol (1000g Phenol, 1.2g Hydroxychinolin, 62.5 ml 1M Tris-OH, 250 ml Aqua dest.) versetzt, gut gemischt (Vortex) und zur Phasentrennung 2 min. in der Tischzentrifuge oder 5 min. bei 8000rpm in der Sorvall abzentrifugiert. Die wässrige nukleinsäurehaltige obere Phase wird abgehoben und zur Entfernung restlichen Phenols 1:1 mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1) versetzt, gemischt und abzentrifugiert. Die Nukleinsäuren werden aus der wässrigen Phase durch Präzipitation mit Ethanol ausgefällt.

Ethanolpräzipitation

Nukleinsäuren werden durch Zugabe von 3 Volumina absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat aus der wässrigen Phase gefällt. Die Präzipitation erfolgt 15 min. bei -70°C oder über Nacht bei -20°C. Das Präzipitat wird dann 10 min. bei 12000rpm abzentrifugiert. Durch zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol wird überschüssiges Salz entfernt. Das Pellet wird in der Lyophylle getrocknet und in geeignetem Volumen H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wird in vertikalen und horizontalen Gel-systemen durchgeführt. Das Laufverhalten kann durch Zumischen von Farbstoffen (Xylenocyanol: 3000bp; Bromphenolblau: 200bp; je in 1% Agarose) beobachtet werden. Zur Auswertung werden die Nukleinsäuren nach Anfärben in Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

a) Agarosegele

Die Agarosekonzentration beträgt in der Regel 1%, Laufpuffer war 1xTBE (40mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM Natriumacetat, 2mM EDTA). Für analytische Überprüfungen werden Horizontalgelkammern verschiedener Größen benutzt, die Geldicke beträgt dabei ca. 3-5mm, die angelegte Stromstärke 250-300mA. Vertikale Agarosegele (20x20x0.1cm und 20x13.5x0.1cm; Stromstärke max. 90mA) werden hauptsächlich zur Überprüfung von in vitro Transkriptionen eingesetzt. Zur Inaktivierung von RNasen werden dem Laufpuffer 100µl/l Diethylpyrocarbonat zugesetzt, die Agarose vor dem Aufkochen mit 20µl/100ml ausgeschüttelt.

b) Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Didesoxysequenzierung werden denaturierende Polyacrylamidgele (5.8% Acrylamid, 0.2% Bisacrylamid, 7M Harnstoff, 1xTBE, 0.1% APS, 0.05% TEMED) verwendet. Die Gelgröße beträgt 20x40 bzw. 20x60cm, die Gelstärke 0.2mm. Die Glasplatten werden wegen des anschließenden Trocknungsverfahrens folgendermaßen präpariert:

- Deckplatte: Polieren mit 2-4ml Repeicote (Dimethyldichlorsilan)
- Bodenplatte: Auftragen einer Lösung aus 5ml Ethanol, 150µl 10% Essigsäure und 15µl Haftsilan (heftet das Acrylamid an die Glasplatte), anschließend 2x mit Ethanol spülen und polieren.

Die Elektrophorese erfolgt bei 1800-2600 Volt in 1xTBE (90mM Tris-OH, 90mM Borsäure, 2.5mM EDTA). Anschließend wird das an der Bodenplatte haftende Gel 10 min. in 10%iger Essigsäure fixiert, 2 min. unter fließendem Wasser gewaschen und 30 min. bei 150°C getrocknet.

Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht auf SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) aufgetrennt.

Die verwendeten Gelgrößen betragen 20x20cm, 20x13.5cm und 20x10.5cm, die Geldicke 1 und 1.5mm. Als Laufpuffer wird 25mM Tris-OH, 192mM Glycin, 0.1% SDS verwendet. Die angelegte Spannung beträgt anfangs 80 Volt und wird nach Eintreten der Proben ins Trenngel auf 150-180 Volt erhöht.

Das Trenngel, dessen Vernetzungsgrad den optimalen Trennbereich bestimmt, wird bei der Herstellung der Gele zuerst gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird ein in der Regel 4.5%iges Sammelgel darübergerlegt, das auch die Probenaschen enthält.

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen in 2x Probenpuffer (4% SDS, 1M Tris-HCl pH 6.8, 10% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.02% Bromphenolblau) 5-15 min. bei 100°C gekocht und kurz abzentrifugiert.

Der optimale Trennbereich dieses Systems liegt zwischen 200 und 15 Kilodalton.

Zusammensetzung verschiedener Gele (Angaben in ml):

	Trenngele						Sammelgel
	7.5%	10%	12.5%	15%	17.5%	20%	4.5%
30% Acrylamid	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	1.67
1% Bisacrylamid	5.8	3.9	3.1	2.6	2.2	2.0	1.30
1.5M Tris-HCl pH8.8	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	-
1.0M Tris-HCl pH6.8	-	-	-	-	-	-	1.25
10% SDS	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.10
H ₂ O	8.8	8.2	6.5	4.5	2.4	0.1	5.60
10% APS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.15
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen zwischen 5 und 20 Kilodalton (kd) wurde ein von Schägger und Jagow (1987) beschriebenes System benutzt. Dieses trennt durch die Verwendung von Tricine anstelle von Glycin Proteine mit geringem Molekulargewicht (< 20 kd) besser auf.

Zusammensetzung verschiedener Tricine-SDS-Gele (in ml):

	Trenngele		Sammelgel
	10%	16.5%	4%
49% Acrylamid/ 1% Bisacrylamid	6.1	10.0	1.0
1x Gelpuffer	10.0	10.0	3.1
29% Glycerin	9.75	9.75	-
H ₂ O	4.0	0.1	8.4
10% APS	0.15	0.15	0.15
TEMED	0.015	0.015	0.015

1x Gelpuffer: 3M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% SDS

Anodenpuffer: 0.2M Tris-HCl pH 8.9

Kathodenpuffer: 0.1M Tris-OH, 0.1M Tricine, 0.1% SDS

Anfärben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese können Proteine in 0.06% Coomassie Brilliant Blue, 50% Methanol, 10% Essigsäure angefärbt werden. Das Entfärben des Gels erfolgt in 5% Methanol, 7.5% Essigsäure.

Aktivitätsgelelektrophorese

Zum Nachweis von Polymeraseaktivität in SDS-Polyacrylamidgelen (Spanos und Hübscher, 1983) wird das Template für die Polymerase, die sog. 'aktivierte DNA', in die Gelmatrix eingebettet. Nach der Elektrophorese werden die Proteine *in situ* renaturiert und mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert. Die Verlängerungsprodukte werden fixiert und zeigen durch die Schwärzung eines Röntgenfilms die Position der Polymerase im Gel an.

a) Präparation 'aktivierter DNA'

Als 'aktivierte DNA' bezeichnet man DNA mit internen freien 3'-OH-Enden (Spanos und Hübscher, 1983). Dazu werden 150mg Kalbsthymus-DNA in 50ml 20mM Tris-HCl pH 7.7, 20mM NaCl gelöst, 15 min. bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf 5mM MgCl₂ eingestellt. Nach Vorwärmen auf 37°C gibt man 25µl DNaseI (200µg/ml) zu und inkubiert 7 min. bei 37°C. Die Lösung wird 2x Phenol extrahiert, die DNA Ethanol gefällt und zu einer Konzentration von 6mg/ml in H₂O aufgenommen.

b) Präparieren von Aktivitätsgelen

Aktivitätsgele werden wie oben beschrieben präpariert mit dem Unterschied, daß die SDS-Konzentration für Trenn- und Sammelgel wie auch für den Laufpuffer auf ein Fünftel reduziert wird (0.02% Endkonzentration) und 100µg/ml aktivierte DNA ins Trenngel einpolymerisiert werden.

c) Probenpuffer und Elektrophorese

Der 2x Probenpuffer besteht aus 100mM Tris-HCl pH 6.8, 0.6% SDS, 2% Nonidet P40, 20% Glycerin, 2mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 300mM NaCl, 4mM EDTA und 0.6% β-Mercaptoethanol. Die Proben werden nicht gekocht, sondern 5 min. bei 37°C vor dem Auftragen inkubiert.

Die Elektrophorese wird bei 4°C durchgeführt.

d) Renaturierung und Polymerasereaktion

Das Renaturieren der Proteine in situ durch Auswaschen des SDS erfolgt durch Schütteln in Renaturierungspuffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) mit häufigem Pufferwechsel bei 4°C. Die Inkubation mit radioaktiv markierten Triphosphaten findet in 70mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 10µM dGTP, 10µM dTTP, 10µM dATP und 1µCi/ml [α -³²P]dCTP bei 37°C statt. Nicht eingebaute Triphosphate werden durch intensives Waschen mit eiskalter Waschlösung (5% Trichloressigsäure, 1% Natriumpyrophosphat) entfernt, das markierte Template gleichzeitig im Gel fixiert. Ist im Waschüberstand keine Radioaktivität mehr nachweisbar, wird das Gel getrocknet und 5-15 min. zur Autoradiographie exponiert.

Restriktion von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgt in Schneidepuffern, deren Ionenkonzentrationen für die jeweiligen Enzyme optimiert wurden. Die DNA-Konzentration eines Ansatzes liegt bei 0.05-0.25µg/µl, die Enzymmenge wird auf einen Verdau innerhalb 1-2 h berechnet. Bei wenig aktiven Enzymen oder präparativen Ansätzen, wenn die Inkubationszeiten verlängert werden müssen, wie auch beim Schneiden in großen Volumina, stabilisiert man die Enzyme mit 50-100µg/ml Rinderserumalbumin. Gestoppt wird ein Restriktionsverdau durch Phenolextraktion oder Zugabe von EDTA (20-50mM Endkonz.).

DNA-Isolierung aus Agarose nach Dretzen et al. (1981)

Die zu isolierenden Restriktionsfragmente werden auf einem präparativen Agarosegel (max. 1.5µgDNA/cm Gel) aufgetrennt und kurz mit Ethidiumbromid angefärbt. Unter langwelligem UV-Licht (366nm) und mit größtmöglicher Schnelligkeit (Schädigung der DNA durch UV!, siehe Cariello et al., 1988) wird vor und hinter die gewünschte DNA-Bande mit dem Skalpell ein Schnitt gesetzt, in den man vorsichtig einen Streifen Whatman DE81-Chromatographiepapier einlegt. Die Elektrophorese wird nun weitergeführt (Apparatur mit Alufolie abgedeckt), bis sich die DNA auf dem DE81-Papier befindet. Dieses wird sodann kurz angetrocknet, die DNA in Elutionspuffer (1.5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA) 2x 20 min bei 70°C eluiert und über Glaswolle abzentrifugiert. Das Eluat wird nochmals scharf abzentrifugiert, bei Raumtemperatur mit drei Volumina Ethanol gefällt, zweimal mit 70% Ethanol nachgewaschen und getrocknet. Die Ausbeute liegt bei 50-70%.

Ligation von DNA

Die kovalente Verknüpfung doppelsträngiger DNA-Moleküle wird durch T4-DNA-Ligase katalysiert. 0.05-0.2pmol DNA werden in einem 15µl-Ansatz mit einer Weiss-Unit T4-Ligase in Ligationspuffer (66mM Tris-HCl pH 7.6, 6.6mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 66µM ATP) 3h bei 15°C inkubiert. Zur Begünstigung von Ringschlüssen arbeitet man mit gleicher DNA- und Ligasemenge in größerem Volumen (50-100µl). Das molare Verhältnis Vektor:Insert sollte 1:10, bei dephosphoryliertem Vektor 1:2 betragen. Für die Einklonierung von Oligonukleotiden wird ein 50-100facher molarer Überschuß an Oligonukleotiden gewählt. Die Verwendung von 10-12% (Endkonzentration) Polyethylenglycoll 6000 begünstigt die Ligation von stumpfen Enden erheblich. Der Ligationsansatz kann direkt zur Transformation eingesetzt werden.

Das Glätten überhängender Enden

Viele Restriktionsendonukleasen schneiden asymmetrisch, d.h. die entstehenden Fragmente haben 3'- oder 5'- überhängende Enden. Diese können unter Verwendung der einzelstrangspezifischen Nuklease S1 (aus *Aspergillus oryzae*) abverdaut werden. Überhängende 5'-Enden glättet das Klenow-Enzym (großes Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli*) durch Auffüllen des Gegenstrangs mit dNTPs.

a) S1 Nuklease

Überhängende DNA-Enden werden mit 0.25 Units S1 Nuklease pro pmol DNA-Ende in 20-30µl S1-Puffer (0.2M NaCl, 50mM Natriumacetat pH 4.5, 1mM Zinksulfat, 0.5% Glycerin) 3 min. bei 37°C abgedaut. Danach wird der Ansatz sofort tiefgefroren, um die Nuklease abzustoppen. Entfernt wird S1 durch Phenolextraktion.

Bei S1-Konzentrationen > 2.5 Units pro pmol DNA-Ende verliert die Nuklease ihre ausschließliche Einzelstrangspezifität und verdaut auch Doppelstrang. Dies kann man sich zunutze machen, um kleinere Deletionen einzuführen. Die Prozessivität ist allerdings stark vom G/C-Gehalt der DNA abhängig (siehe Kapitel 2.1.6.).

b) Klenow-Enzym

Die Auffüllreaktion wird in 50mM Tris-HCl pH 7.2, 10mM MgSO₄, 0.1mM Dithiothreitol, 50µg/ml Rinderserumalbumin, je 0.5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 2 Einheiten Klenow-Enzym pro pmol DNA-Ende in einem 30µl-Ansatz 1h bei 37°C inkubiert.

Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die alkalische Kälberdarmphosphatase (CIP) katalysiert die Hydrolyse zahlreicher Phosphatester; sie wird daher zur Abspaltung des Phosphatrestes am 5'-Ende von Nukleinsäuren verwendet. Die Inkubation erfolgt in 50mM Tris-HCl pH 9.0, 1mM $MgCl_2$, 0.1mM $ZnCl_2$, 1mM Spermidin in einem 50 μ l-Ansatz mit 0.01 Einheiten CIP pro pmol 5'-Enden bei 37°C. Um überhängende 5'-Enden zu dephosphorylieren, inkubiert man 30min, gibt dann ein zweites Aliquot CIP dazu und inkubiert für weitere 30min. Um DNA mit glatten oder 3'-überhängenden Enden zu dephosphorylieren, inkubiert man 15min bei 37°C und 15min. bei 56°C. Nach Zugabe eines weiteren Aliquots CIP wiederholt man die Inkubation bei beiden Temperaturen (Maniatis et al., 1982). Zur Inaktivierung der CIP chelatiert man die Zinkionen mit 10mM Natriumtrinitrioloacetat. In Abwesenheit von Zink ist CIP thermolabil. Sie wird dann durch 45minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert und durch Phenolextraktion entfernt.

Phosphorylierung von 5'-Enden

Zur radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren am 5'-Ende wird die γ -Phosphatgruppe von [γ - ^{32}P]ATP durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK) auf das freie 5'-OH übertragen. 3'-OH-Gruppen sind kein Substrat und bleiben unphosphoryliert. Üblicherweise wird ein 3-4-facher molarer Überschuß von [γ - ^{32}P]ATP in der Lyophylle getrocknet und mit der Nukleinsäure in 20mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM $MgCl_2$, 1mM Dithioerythrit, 5% Glycerin und 5 Einheiten PNK 15min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es schließen sich eine Phenolextraktion und zur Abtrennung nicht eingebauter Triphosphate eine Gelfiltration an.

Die nicht-radioaktive Phosphorylierung von Nukleinsäuren findet unter gleichen Bedingungen statt. Das [γ - ^{32}P]ATP wird durch 1mM ATP ersetzt.

Gelfiltration von Nukleinsäuren

Zur Abtrennung von freien Triphosphaten nach Markierungsreaktionen wie auch z.B. zur Entsalzung wird eine Gelfiltration über Sephadex-Säulen durchgeführt. Dabei entscheidet die Porengröße des Sephadex über die Größe der Moleküle im Ausschluß. So verwendet man Sephadex-G25 für Oligonukleotide und G100 für Restriktionsfragmente. Das in H_2O gequollene Säulenmaterial wird in mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten gepackt und mit 2 Säulenvolumina 10mM Ammoniumbicarbonat (ABC) äquilibriert. Die Nukleinsäurelösung wird in max. 200 μ l

Volumen aufgetragen und in Fraktionen zu je 4 Tropfen (ca. 100µl) gesammelt. Diese werden im Scintillationszähler gezählt, die Peak-Fraktionen vereinigt, in der Lyophylle getrocknet und zweimal mit H₂O nachgewaschen, um überschüssiges ABC abzdampfen.

Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die sich nach der Synthese in 25% Ammoniak befinden, werden 5-6h bei 55°C inkubiert, um die Schutzgruppen abzuspalten. Man kühlt sie dann bei -20°C ab, um einen Siedeverzug beim anschließenden Eintrocknen in der Lyophylle durch NH₄OH zu vermeiden. Nach Aufnehmen in 200µl H₂O und nochmaligem Eindampfen nimmt man dann die Oligonukleotide in 500µl H₂O auf. Es schließt sich zur Entsalzung eine Gelfiltration über eine Sephadex-G25 Säule an; die Peak-Fraktionen werden durch Tüpfeln auf eine Ethidiumbromid-Platte (1% Agarose mit 0.7µg/ml EtBr) bestimmt, vereinigt, lyophilisiert und mit H₂O nachgewaschen. Die Konzentration wird durch Messung der optischen Dichte bei 260nm bestimmt. 1 OD₂₆₀ entspricht 33.3µg/ml. Die Oligonukleotide sind nun zur 5'-Markierung, zur Klonierung oder Sequenzierung bereit.

In vitro Mutagenese

Die folgende Vorschrift zur gezielten Mutagenese von DNA-Sequenzen mithilfe mutagener Oligonukleotide wurde von Stanssens et al. (1986) übernommen. Abbildung 4 zeigt schematisch die notwendigen Schritte, die im einzelnen nachfolgend beschrieben werden.

- I. Insertion der zu mutierenden DNA-Sequenz in pMa5-8 und pMc5-8 über die Restriktionsschnittstellen R1 und R2. Die Orientierung des mutagenen Oligonukleotids bestimmt, welches der beiden Plasmide für Schritt II, Präparation von Einzelstrang-DNA, und welches für Schritt III, Fragmentpräparation, verwendet werden muß.
- II. Präparation von Einzelstrang-DNA (hier beschrieben für pMa-Derivat pMaX):
 - Nach der Umklonierung wurde pMaX auf M9-Minimalplatten ausgestrichen
 - Aufwachsen der Bakterien in 10ml Standard I/ 100µg/ml Ampicillin für 4-5 h; OD₄₅₀ ≈ 0.1
 - Zugabe von 100µl (10¹² pfu/ml) Phagenüberstand M13KO7; nach etwa 30 min. einstellen auf 75µg/ml Kanamycin; über Nacht bei 37°C inkubieren
 - 10 min. 10000 rpm in Corex-Röhrchen abzentrifugieren
 - Überstand mit 1/4 Vol. PEG-Lösung (20% Polyethylenglykol 6000, 2.5M NaCl) versetzen, gut vortexen und 15 min. auf Eis inkubieren
 - 10 min. bei 8000 rpm abzentrifugieren, Pellet etwa 10 min. an der Luft antrocknen lassen

- Pellet aufnehmen in 300 μ l TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA) und überführen in 1.5ml-Reaktionsgefäße
- 300 μ l Phenol zugeben, 20 sec. vortexen und 10 min. auf Eppendorfschüttler mischen
- 3 min. zentrifugieren, wässrige Phase mit 300 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahieren
- Einzelstrang-DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 5M NaClO₄ fällen, kurz vortexen und 20 min. abzentrifugieren
- Pellet in 50 μ l TE-Puffer aufnehmen; erwartete DNA-Konzentration ist 0.25-1.0 μ g/ μ l. (Zur Bestimmung der optischen Dichte: 1OD₂₆₀ = 33 μ g/ml Einzelstrang-DNA).
- 2-4 μ l werden auf einem vertikalen Agarosegel aufgetrennt, als Kontrolle dient die DNA des Helferphagen

III. DNA-Präparation des pMc-Derivats (pMcX) aus 20ml-Kultur (25 μ g/ml Chloramphenicol).

Schneiden von pMcX mit geeigneten Restriktionsenzymen im Bereich der zu mutierenden Sequenz und Präparation des Vektorfragments nach Dretzen et al.

IV. Hybridisierung des pMc-Vektorfragments auf die Einzelstrang-DNA zum gap-duplex:

- 0.1 pmol pMcX-Fragment werden mit 0.5 pmol Einzelstrang-DNA (pMaX) mit 5 μ l 1.5M KCl, 100mM Tris-HCl pH 7.5 in einem Gesamtvolumen von 40 μ l 4 min. bei 100°C erhitzt, 5-10 min. bei 65°C inkubiert und dann auf Eis bis zur Verwendung aufbewahrt oder eingefroren. 10 μ l des Ansatzes werden auf einem vertikalen Agarosegel zur Kontrolle des gap-duplexes aufgetrennt

V. Hybridisierung des mutagenen Oligonukleotids und Auffüllreaktion:

- 8 μ l der gap-duplex-DNA werden mit 2 μ l kinasiertem Oligonukleotid 5 min. bei 65°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.
- Zugabe von 4 μ l Fill-in Puffer (625mM KCl, 275mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM MgCl₂, 20mM DTT, 0.5mM ATP, 0.25mM dNTP), 1 μ l T4 DNA Ligase (5U/ μ l), 1 μ l Klenow-Enzym (1U/ μ l) und 24 μ l H₂O; Inkubation 45 min. Raumtemperatur

VI. 5 μ l der Auffüllreaktion werden in kompetente E.coli WK6mutS nach der CaCl₂-Methode

transformiert. 100 μ l werden auf Standard I Platten mit 25 μ g/ml Chloramphenicol ausplattiert, um die Transformationseffizienz zu überprüfen; 900 μ l werden zum Animpfen einer 10ml Flüssigkultur (25 μ g/ml Chloramphenicol) verwendet. Aus 3ml wird nach der RAPP-Methode Plasmid-DNA präpariert und deren Größe überprüft. Ein Aliquot wird dann in E.coli JM105 transformiert; diese Klone werden auf die Mutation hin meist durch Sequenzierung der DNA überprüft.

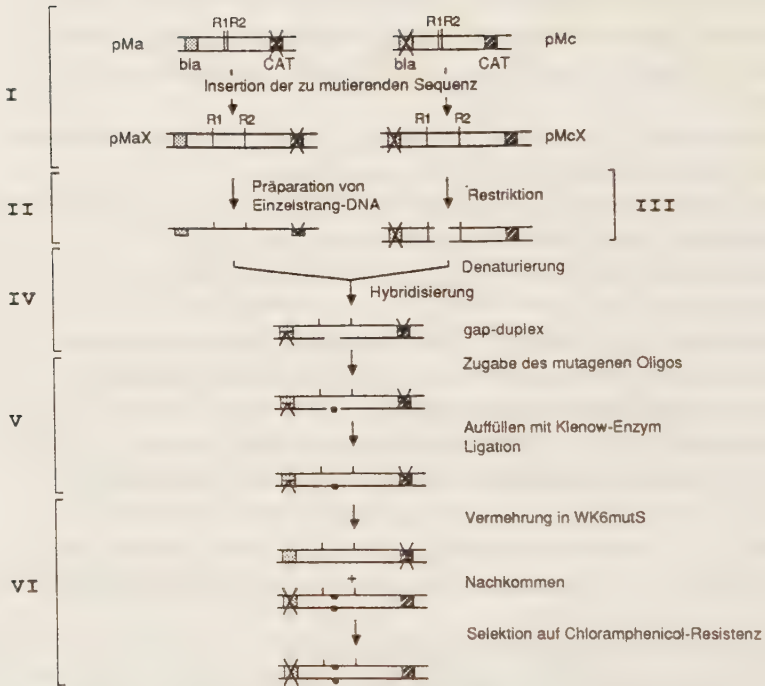


Abb.4. Schematische Darstellung der Oligonukleotidmutagenese nach der Gap-Duplex-Methode. Die einzelnen Schritte, deren Durchführung im Text genau erklärt ist, sind mit römischen Ziffern bezeichnet.

Didesoxysequenzierung von doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mit der von F. Sanger (1977) erstmals beschriebenen Didesoxymethode nach zwei verschiedenen Verfahren durchgeführt. Sie beruhen beide auf der Verlängerung eines Oligonukleotidprimers am denaturierten Template mit dem Einbau von Didesoxynukleotiden in vier verschiedenen Reaktionen, was zu statistischen Kettenabbrüchen führt. Diese werden auf denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert.

a) Denaturierung der DNA

2µg Plasmid-DNA werden einrotiert, in 40µl Denaturierungspuffer (0.2M NaOH, 0.5mM EDTA) aufgenommen und 7 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Neutralisierung mit 4µl 2M Ammoniumacetat pH 4.5 für 2 min. bei RT wird die DNA mit 150µl Ethanol 7 min. bei -70°C gefällt, abzentrifugiert, zweimal mit 70% Ethanol nachgewaschen und getrocknet.

b) Hybridisierung des Primers

Die denaturierte DNA wird ad 10µl mit 0.5-2pmol Oligoprimern, 2µl 5x Sequenzierpuffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM MgCl₂, 250mM NaCl, 5mM DTT für Klenow; 200mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM MgCl₂, 250mM NaCl für Sequenase™) und H₂O aufgenommen, 2 min. auf 65°C erhitzt und langsam auf <35°C abgekühlt.

c) Sequenzierung mit Klenow-Enzym

- Jede der vier Verlängerungsreaktionen erhält:

- 2.0µl der hybridisierten Primer-Template-Mischung
- 2.0µl 50mM DTT
- 1.0µl Klenow-Enzym (1U/µl)
- 0.5µl [α -³⁵S]dATP
- 3.0µl Didesoxymix
- 1.5µl H₂O

Die Ansätze werden durch Anzentrifugieren gemischt und 20 min. bei 37°C inkubiert

- Zugabe von 1µl Chase Solution (2mM dNTP), weitere 20 min. 37°C

- Lyophilisieren der Proben, Aufnahme in 6µl FM (0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol, 0.37% Na₂EDTA pH 7.0 gelöst in Formamid), Denaturieren durch 4 min. Kochen bei 100°C, Abkühlen in Eiswasser

- Auftragen von 1-2µl auf Sequenzgel (6% AA/ 7M Harnstoff/ 1xTBE)

d) Sequenzierung mit Sequenase™

Sequenase™ (Tabor und Richardson, 1987) ist eine modifizierte T7 DNA Polymerase, deren Vorteile gegenüber dem Klenow-Enzym wie hohe Prozessivität, hohe Geschwindigkeit und der effiziente Einbau von Nukleotidanaloga wie Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) und α -Thiodidesoxynukleosidtriphosphaten ([α -³⁵S]dNTPs), wie sie für die Sequenzierung notwendig sind, ein einfaches und schnelles Protokoll ermöglichen.

- ³²S-Markierung: Zur Primer-Template-Mischung werden 1 µl 0.1M DTT, 2 µl Labeling-Mix (je 1.5 µM dGTP, dCTP, dTTP), 0.5 µl [α -³²S]dATP, 2 µl 1:8 verdünnte Sequenase™ pipettiert und 5 min. bei RT inkubiert.
- Termination: je 3.5 µl der Markierungsreaktion werden mit 2.5 µl vorgelegtem Terminationsmix (80 µM dNTPs, 8 µM des jeweiligen ddNTPs) gemischt und 5 min. bei 37°C inkubiert.
- Stop: Die Reaktionen werden durch Zugabe von 4 µl Stop-Puffer (0.05% Xylencyanol FF, 0.05% Bromphenoiblauf, 20mM EDTA, 95% Formamid) gestoppt. Vor dem Gelauftrag denaturiert man die Proben 2 min. bei 75°C.

In vitro Transkription

Die in vitro Transkription mit SP6-RNA-Polymerase orientiert sich an einer Laborvorschrift von M.Birnstiel, die sich an der von Melton et al. (1984) modifizierten Vorschrift von Butler und Chamberlain (1982) anlehnt. Dazu linearisiert man die über einen Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten gereinigten Plasmide 3' der zu transkribierenden Sequenz mit einem geeigneten Restriktionsenzym. Nach Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation nimmt man das Template in H₂O zu einer Konzentration von 0.25 µg/µl auf. Der Transkriptionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 8.0 µl 5x Transkriptionspuffer (200mM Tris-HCl pH7.5, 30mM MgCl₂, 50mM DTT, 10mM Spermidin)
- 8.0 µl cap-NTP-Mix (2.5mM ATP, 2.5mM UTP, 2.5mM CTP 0.25mM GTP, 0.7mM ⁷mGpppG [= cap-Nukleotid])
- 4.0 µl linearisierte Plasmid-DNA
- 1.0 µl RNasin (RNase Inhibitor)
- 1.5 µl SP6-RNA-Polymerase (15 Units)
- 17.5 µl H₂O

Um ein Ausfällen der Template-DNA durch Spermidin zu verhindern, muß der Ansatz bei Raumtemperatur zusammenpipettiert werden. Die Inkubation erfolgt 1h bei 40°C. 3-4 µl des Ansatzes analysiert man auf einem vertikalen 1%igen Agarosegel. Drei Einheiten RNase-freie DNaseI bauen anschließend in 10min. bei 37-40°C die DNA ab. Die Reaktion wird dann sofort durch Phenolextraktion gestoppt. Die synthetisierte RNA nimmt man je nach Quantität in 8-16 µl H₂O auf.

Um Kontamination mit Ribonukleasen zu minimieren, werden Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße silikonisiert (Maniatis et al., 1982), H₂O mit Diethylpyrocarbonat (DEPC; 100 µl/l) ausgeschüttelt und autoklaviert, sowie dem Agarosegel mitsamt seinem Laufpuffer 100 µl/l DEPC zugesetzt.

In vitro Translation

Als zellfreie Translationssysteme wurden Kaninchen-Retikulozytenlysate und Weizenkeimextrakte verwendet. Ein spezieller Prozessierungs-Translationskit diente zum Studium kotranslationaler Prozessierung.

In vitro Translation mit Promega Biotec Retikulozytenlysat

Dieses Lysat wurde standardmäßig zur Herstellung radioaktiv markierter Proteine verwandt. Auf Eis werden pro Ansatz

- 35.0µl Retikulozytenlysat (durch Handwärme aufgetaut)
- 1.25µl RNasin (50 Units)
- 3.3µl L-³⁵S-Methionin (50µCi)
- 1.0µl Aminosäuremix (Mischung aller Aminosäuren ohne Methionin)
- 7.5µl H₂O

gemischt und zu 2µl vorgelegter RNA (aus in vitro Transkription) zugegeben. Nach 40-60 minütiger Inkubation bei 30°C ist die Proteinsynthese beendet. Das Lysat kann nun direkt auf einem Proteingel analysiert (3-5µl) oder zur Immunpräzipitation weiterverwendet werden.

Das Retikulozytenlysat N.90 von Amersham Buchler, Braunschweig, wurde nur kurze Zeit verwendet und wegen seiner schlechten Translationseffizienz durch das Promega-Lysat ersetzt.

In vitro Translation mit Promega Biotec Weizenkeimextrakt

Ein 50µl-Ansatz inkubiert 120 min. bei 25°C mit folgender Zusammensetzung:

- 25.0µl Weizenkeimextrakt
- 2.0µl 10mM MgAc
- 3.5µl 1M KAc
- 1.3µl RNasin (50 Units)
- 4.0µl Aminosäuremix (minus Methionin)
- 3.3µl L-³⁵S-Methionin (50µCi)
- 2.0µl RNA
- 9.0µl H₂O

In vitro Translation in Gegenwart mikrosomaler Membranen

Dazu wurde das Protein-Prozessierungs-Translationssystem NEK-019 von New England Nuclear eingesetzt. Zunächst wurde ein sog. 'premix' vorbereitet, der sich pro Ansatz wie folgt zusammensetzt:

- 3.3 µl L-³⁵S-Methionin (50 µCi)
- 5.5 µl Translationscocktail
- 3.0 µl 1M KAc
- 0.4 µl 50mM MgAc
- 0.8 µl H₂O

Der Translationscocktail enthält werksseitig optimierte Translationskomponenten wie Spermidin, Kreatinphosphat, DTT, GTP in HEPES-[N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure] Puffer.

Zu 13 µl 'premix' werden nun 10 µl Retikulozytenlysat und 2 µl RNA pipettiert und mit vorgelegten Membranen gemischt, die ad 1 µl mit HEPES-Puffer komplementiert wurden. Die Inkubationsdauer beträgt 1h bei 37°C.

Sollen zusätzliche Reagenzien wie z.B. Proteasehemmer in Translationsreaktionen eingesetzt werden, wird entsprechend weniger H₂O verwendet.

Immunpräzipitation

Radioaktiv markierte Proteine werden immunologisch durch Immunpräzipitation charakterisiert.

- Zunächst wird ProteinA-Sepharose CL-4B in RIPA-Puffer (150mM NaCl, 10mM Na₂PO₄ pH 7.5, 1% Nonidet P40, 0.5% Natriumdesoxycholat, 0.1% SDS) 1h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C gequollen und 3x mit RIPA gewaschen.
- 50 µl Gelbett werden mit 7-15 µl des Antiserums 1h bei RT in einem Gesamtvolumen von 200 µl RIPA auf einem Eppendorfschüttler inkubiert.
- Der Serumüberstand wird durch 3-5maliges Waschen mit je 1ml RIPA entfernt.
- Die Inkubation mit dem Antigen (10 µl einer in vitro Translation) erfolgt für 2h in einem Gesamtvolumen von 500-600 µl RIPA ebenfalls auf dem Eppendorfschüttler.
- Nach 3-5maligem Waschen mit je 1ml RIPA werden die gebundenen Proteine in 50 µl SDS-Probenpuffer durch 5-20minütiges Kochen eluiert.

- 10-25µl des Überstandes werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Dieses wird nach dem Lauf zur Fluorographie (Laskey und Mills, 1975) 15-20 min. in 1M Natriumsalicylat geschwenkt, getrocknet und autoradiographiert.

Western Blot Technik

In einem Western- oder auch Immunoblot (Burnette, 1981) werden Proteine immunologisch indirekt dadurch nachgewiesen, daß gebundene Antikörper durch ^{125}J -markiertes ProteinA sichtbar gemacht werden.

- Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel.
- Elektrophoretischer Transfer der Proteine (Blot) auf Nitrozellulosefilter BA85 in Transferpuffer (25mM Tris-OH, 192mM Glycin, 20% Methanol) 3h bei 500mA oder über Nacht bei 150mA.
- Transferkontrolle durch Anfärben der Nitrocellulose mit PonceauS (1mg/ml); dabei Entfernung von Acrylamidresten; Entfärben in PBS (8mM Na_2HPO_4 , 2mM NaH_2PO_4 , 140mM NaCl).
- Absättigen freier Proteinbindungsstellen durch Inkubation in 1% BSA (Rinderserumalbumin)/PBS mind. 6h bei RT.
- Inkubation mit dem Antiserum (Verdünnung $1-3 \times 10^{-3}$) mind. 2h in 1% BSA/PBS.
- Waschen des Filters 4x 15min. in 0.1% NP40/PBS und 4x 15min. in PBS.
- 2h Inkubation in 1% BSA/PBS.
- Zugabe von 0.1µCi/ml ^{125}J -ProteinA und 3h Inkubation bei RT.
- Waschen mind. 5x in 0.1% NP40/PBS, kurz in H_2O .
- Trocknen des Filters an der Luft und Autoradiographie.

Vorbereitung von Leber- und Serumproben für Western Blot

Leberproben werden in gefrorenem Zustand gewogen und mit 10µl/mg SDS-Probenpuffer 30 min. bei 100°C gekocht. Anschließend beschallt man 2x 15 sec., zentrifugiert ungelöste Bestandteile 5 min. in der Tischzentrifuge ab und trägt 10-25µl pro Gel auf. Serum wird 1:10 in SDS-Probenpuffer verdünnt und 15 min. gekocht (10µl pro Gel).

DNA-Extraktion aus Lebergewebe

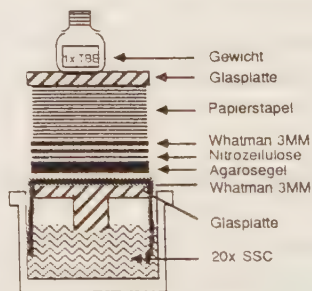
- 0.1-0.5g Lebergewebe werden in 3ml TNE (140mM Tris-HCl pH 7.5, 140mM NaCl, 10mM EDTA) homogenisiert oder nach Pulverisieren unter flüssigem Stickstoff in 3ml TNE aufgenommen.

- Nun gibt man 300µl 10% SDS zu, die Lösung wird viskös.
- Je nach experimentellem Ansatz erfolgt vor der Phenolextraktion noch ein Verdau mit ProteaseK (200µg/ml Endkonzentration; 3-15h 37°C).
- Die Phenolextraktion wird solange wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr sichtbar ist; danach erfolgen Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation. Die viskose Lösung darf nicht gevortext werden.
- Das Pellet der Ethanolfällung wird nur kurz angetrocknet und in möglichst wenig Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Southern Blot Technik

Diese Technik wird benutzt, um DNA aus einem Agarosegel auf Nitrozellulosefilter zu transferieren und sie dort mit radioaktiv markierten Proben zu hybridisieren (Southern, 1975).

- 20µl der nach obiger Vorschrift extrahierten DNA werden auf einem 1%igen Agarosegel mit mind. 20cm Länge aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert.
- Es schließt sich eine 15minütige Denaturierung in 0.25M HCl an.
- Nach zweimaligem Waschen des Gels in H₂O wird es 2x 15min. in SOAK I (0.5M NaOH, 1M NaCl) und 2x 15min. in SOAKII (0.5M Tris-HCl pH 7.4, 3M NaCl) neutralisiert.
- Der Transfer auf Nitrocellulose findet über Nacht in 20x SSC nach dem abgebildeten Schema statt.
- Nach dem Transfer wird die Nitrozellulose kurz in 5x SSC geschwenkt und anschließend 2h im Vakuumofen bei 80°C gebacken.
- Nach Einweichen in 5x SSC wird 1h bei 68°C in 1x Maniatis-Puffer (600mM NaCl, 120mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% NaH₂P₂O₇, 0.2% Rinderserumalbumin, 0.2% Ficoll, 0.2% Polyvinylpyrrolidon), dann 1h in Maniatis-Puffer mit 50µg/ml Kalbsthymus-DNA inkubiert.
- Die Hybridisierung findet in möglichst geringem Volumen Maniatis-Puffer (max.12ml) bei 68°C über Nacht mit > 10⁶cpm/ml radioaktiv markierter DNA-Probe statt. Diese wurde zuvor 5 min. bei 100°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt.
- Gewaschen wird kurz in 5x SSC, 1h 68°C in Maniatis-Puffer, 3x 15 min. in Waschlösung I (450mM NaCl, 90mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Na₂P₂O₇ pH 6.8) bei 68°C, 2x 1h Waschlösung I bei RT und schließlich 1h in Waschlösung II (150mM NaCl, 30mM Tris-HCl pH 8.0,



0.5mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$ pH 6.8). Das Filter wird getrocknet und autoradiographiert.

Radioaktive Markierung von doppelsträngiger DNA

a) Nick translation

Die Reaktion nutzt die Fähigkeit der DNA-Polymerase I aus, an freien 3'-OH Enden DNA-Synthese zu initiieren. Die 3'-OH Enden werden durch limitierten DNaseI-Verdau der Template-DNA geschaffen. Die Polymerase synthetisiert nun neue DNA in 5'-3'-Richtung und benutzt dabei radioaktiv markierte Triphosphate, die neusynthetisierte DNA ist daher radioaktiv.

10 μl [α - ^{32}P]dCTP (= 100 μCi) werden lyophilisiert, in 5 μl DNA-Lösung (0.75 μg), 2 μl NT-Mix (je 200 μM dGTP, dATP, dTTP) und 2 μl H_2O aufgenommen und 1h bei 15°C mit 1.1 μl DNA-PolymeraseI inkubiert. 80 μl TE-Puffer werden zugegeben, der Überstand der folgenden Phenolextraktion zur Abtrennung der nicht eingebauten Triphosphate über eine Sephadex G100-Säule filtriert. Die spezifische Aktivität der DNA sollte 1-5x10⁶cpm/ μg betragen.

b) Multiprime DNA Markierung

Feinberg und Vogelstein (1983) führten den Gebrauch von Hexanukleotiden zufälliger Sequenz als Primer für DNA-Synthese an verschiedenen Stellen denaturierter DNA ein. Diese Methode wird zur radioaktiven Markierung einzel- wie doppelsträngiger DNA mithilfe des Klenow-Enzyms verwendet und ergibt eine hohe spezifische Aktivität der markierten DNA.

10 μl (25ng) DNA werden 4 min. bei 100°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt. Die Verlängerungsreaktion startet nach Zugabe von 11 μl Puffer 1 (dATP, dGTP, dTTP, Tris-HCl pH 7.8, MgCl_2 , β -Mercaptoethanol, Mischung der Hexanukleotide), 4 μl Puffer 5 (5mg/ml BSA), 5-10 μl (50-100 μCi) [α - ^{32}P]dCTP, 13-18 μl H_2O und 2 μl Klenow-Enzym (2 Units) und inkubiert 3h bei 37°C. Die Abtrennung nicht eingebauter Triphosphate erfolgt über Sephadex G100. Die spezifische Aktivität der DNA beträgt 1-5x10⁶dpm/ μg .

Expression von Fusionsproteinen in E.coli und deren Reinigung

- Die E.coli Stämme 537 oder 2136 werden mit den beschriebenen MS2-Expressionsplasmiden transformiert. Eine 20ml-Kultur wird über Nacht unter Selektionsdruck (537: Kanamycin/Ampicillin;

2136; Ampicillin) bei 28°C aufgewachsen, durch Zugabe von 20ml (80ml) auf 65°C (42°C) erwärmtes StandardI-Medium auf 42°C gebracht und 2h bei 42°C geschüttelt. [Für ein analytisches Gel 1.5ml pelletieren und in 150µl SDS-Probenpuffer aufnehmen; davon 30-50µl/Gel].

- Die Bakterien werden nun 5 min. bei 7000rpm abzentrifugiert, in 3ml PBS gewaschen, nochmals pelletiert, in 800µl PBS resuspendiert und in 2.2ml-Reaktionsgefäße überführt.
- Das Aufschließen der Zellen erfolgt durch Zugabe von 200µl Lysozym (20mg/ml). Nach 30 min. Inkubation bei 37°C werden die Ansätze 6x 15 sec. ultrabeschallt und auf zwei Röhrchen aufgeteilt.
- Pro Röhrchen wird 1ml Triton-Lytic-Mix (0.1% Triton X100, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 62.5mM EDTA) zugegeben, 15 min. bei 37°C inkubiert, 6x 15 sec. beschallt und 15 min. bei 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand (Ü1; 35µl/Gel) wird aufbewahrt,
- das Pellet durch 2x 15 sec. Beschallen in 1ml 1M Harnstoff resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wird 15 min. bei 14000rpm abzentrifugiert, der Überstand (Ü2; 35µl/Gel) aufbewahrt,
- das Pellet wie zuvor in 1ml 7M Harnstoff suspendiert, inkubiert und zentrifugiert, Ü3 wird aufbewahrt (25µl/Gel), das Pellet in 200-500µl SDS-Probenpuffer (20-40µl/Gel) aufgenommen. In dieser Fraktion befinden sich in der Regel >90% des Fusionsproteins.
- Zur weiteren Aufreinigung wird das Material einer präparativen Gelelektrophorese unterworfen. Das Fusionsprotein wird nach kurzem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue aus dem Gel ausgeschnitten, entfärbt, gewässert und durch Elektroelution in Tris-Glycin-SDS-Puffer aus dem Polyacrylamid befreit. Nach Dialyse gegen H₂O wird die Proteinlösung durch Lyophilisieren eingengt, die Reinheit auf einem SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

Herstellung von Antiseren

Weißer Neuseeländer Kaninchen wurden mit 200µg Fusionsprotein in Freund's Complete Adjuvans (Herbert, 1973) subkutan immunisiert. Die Injektion mit gleichen Mengen Protein in Freund's Incomplete Adjuvans wurde in 2-wöchigen Abständen mehrmals wiederholt. Nach der dritten Immunisierung wurde den Tieren erstmals aus der Ohrvene Blut (10-40ml) entnommen. Das über Nacht bei 4°C geronnene Blut wurde durch Zentrifugation (5 min. 6000rpm) vom Blutkuchen getrennt. Die verbleibenden Blutzellen wurden dann in einem zweiten Zentrifugationsschritt (10 min. 10000rpm) pelletiert. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -70°C.

Eigene Publikationen, Vorträge und Abstracts

- Theilmann, L., Weimer, T., Gmelin, K. and Will, H. (1985): Molekularbiologische Aspekte der Hepatitis-B-Virusinfektion. *Innere Medizin* 12:259-264.
- Weimer, T. and Will, H. (1986): Gene expression of WHV in hepatocellular carcinoma. In: *Proceedings IXth International Congress of Infectious and Parasitic Diseases, Viral Infections Vol.1*. Eds. Marget, W., Lang, W. and Gabler-Sandberger, E. MMV Verlag München.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. and Schaller, H. (1987): Replication strategy of human hepatitis B virus. *Journal of Virology* 61:904-911.
- Weimer, T., Salfeld, J. and Will, H. (1987): Expression of the hepatitis B virus core gene in vitro and in vivo. *Journal of Virology* 61:3109-3113.
- Schödel, F., Weimer, T., Will, H. and Sprengel, R. (1988): Amino acid sequence similarity between retroviral and E.coli RNaseH and hepadnaviral gene products. *AIDS Research and Human Retroviruses* 6:9-11.
- Schödel, F., Sprengel, R., Weimer, T., Fernholz, D., Schneider, R. and Will, H. (1989): Animal hepatitis B viruses. *Advances in Viral Oncology*, Vol.8:72-103. Edt. by G. Klein. Raven Press, New York.
- Fuchs, K., Heberger, C., Weimer, T., and Roggendorf, M. (1988): Characterization of WHV DNA and RNA in hepatocellular carcinoma of woodchucks. *Hepatology*, im Druck.
- Weimer, T., Millman, I., Feitelson, M. and Will, H. (1986): Hepatitis B virus gene expression in tumor and nontumor tissue. Abstracts of papers presented at the Hepatitis B Viruses Meeting in Cold Spring Harbor, New York.
- Will, H., Weimer, T., Sprengel, R., Stemler, M., Schröder, C., Fernholz, D., Wan, D.F., Schneider, R. (1987): Hepadnavirus gene expression in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry, Supp.* 11D, Alan R. Liss Inc. New York.
- Stemler, M., Weimer, T., Hess, J., Braun, R., Will, H. and Schröder, C.H. (1987): Detection of antibodies against three domains of the hepatitis B virus polymerase protein. Abstracts of papers presented at the Hepatitis B Virus Meeting in Cold Spring Harbor, New York.
- Weimer, T. and Will, H. (1988): Expression and replication of woodchuck hepatitis virus in chronically infected liver and primary liver carcinoma. *Zentralblatt für Bakteriologie, Hygiene und Mikrobiologie* 268 (1):113.
- Weimer, T. and Will, H. (1988): Ribosomal frameshifting in hepatitis B virus pol gene expression. Abstracts of papers presented at the 1988 Hepatitis B Virus Meeting, San Diego.

Literatur

- Acs, G., Sells, M.-A., Purcell, R.H., Price, P., Engle, R., Shapiro, M. and Popper, H. (1987): Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4641-4644.
- Albin, C., and Robinson, W.S. (1980): Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* 34:297-302.
- Almeida, J.D. (1971): Electron microscopic observations and speculations on Australia antigen. *Postgrad. Med. J.* 47:484-487.
- Arnold, W., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Hess, G. and Knolle, J. (1975): The diagnostic significance of intrahepatocellular hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B core antigen (HBcAg) and IgG for the classification of inflammatory liver diseases. *Klin. Wochensh.* 53:1069-1074.
- Atkins, J.F., Elseviers, D. and Gorini, L. (1972): Low activity of β -galactosidase in frameshift mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1192-1195.
- Bauer, G. and Temin, H.M. (1980): Specific antigenic relationships between the RNA-dependent DNA polymerases of avian reticuloendotheliosis viruses and mammalian type C retroviruses. *J. Virol.* 34:168-177.
- Bavand, M.R. and Laub, O. (1987): Two proteins with reverse transcriptase activities associated with hepatitis B virus-like particles. *J. Virol.* 62:626-628.
- Beasley, R.P., Lin, C.-C., Hwang, L.-Y. and Chien, C.-S. (1981): Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 2:1129-1133.
- Benbrook, D., Lernhardt, E. and Pfahl, M. (1988): A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333:669-672.
- Berger, I. and Shaul, Y. (1987): Integration of hepatitis B virus: analysis of unoccupied sites. *J. Virol.* 61:1180-1186.
- Bird, A.P. (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
- Bishop, J.M. (1985): Viral oncogenes. *Cell* 42:23-28.
- Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1985): Functions and origins of retroviral transforming genes. Edited by Weiss, R., Teich, N., Varmus, H.E. and Coffin, J. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses*, Ch.9S. Cold Spring Harbor Press, New York, pp.249-356.
- Bosch, V., Bartenschlager R., Radziwill, G. and Schaller, H. (1988): The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* 166:475-485.
- Brierley, I., Bournsnel, M.E.G., Binns, M.M., Bilimoria, B., Blok, V.C., Brown, T.D.K. and Inglis, S.C. (1987): An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* 6:3779-3785.

- Bruce, A.G., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. (1986): tRNA anticodon replacement experiments show that ribosomal frameshifting can be caused by doublet decoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5062-5066.
- Büscher, M., Reiser, W., Will, H. and Schaller, H. (1985): Transcripts and the putative RNA pregenome of duck hepatitis B virus: Implications for reverse transcription. *Cell* 40:717-724.
- Butler, E.T. and Chamberlain, M.J. (1982): Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 257:5772-5778.
- Burnette, W.N. (1981): "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from SDS polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.
- Cariello, N.F., Keohavong, P., Sanderson, B.J.S. and Thilly, W.G. (1988): DNA damage produced by ethidium bromide staining and exposure to ultraviolet light. *Nucl. Acids Res.* 16:4157.
- Cattaneo, R., Will, H., Hernandez, N. and Schaller, H. (1983): Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 305:336-338.
- Cattaneo, R., Will, H. and Schaller, H. (1984): Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* 3:2191-2196.
- Chang, C., Enders, G., Sprengel, R., Peters, N., Varmus, H.E. and Ganem, D. (1987): Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J. Virol.* 61:3322-3325.
- Chisari, F.V., Filippi, P., McLachlan, A., Milich, D.R., Riggs, M., Lee, S., Palmiter, R.D., Pinkert, C.A. and Brinster, R.L. (1986): Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J. Virol.* 60:880-887.
- Chisari, F.V., Filippi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1987): Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6909-6913.
- Clare, J.J., Belcourt, M. and Farabaugh, P.J. (1988): Efficient translational frameshifting occurs within a conserved sequence of the overlap between the two genes of a yeast Ty1 transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6816-6820.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *E.coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-2114.
- Cohen, J.I., Miller, R.H., Rosenblum, B., Denniston, K., Gerin, J.L. and Purcell, R.H. (1988): Sequence comparison of woodchuck hepatitis virus replicative forms show conservation of the genome. *Virology* 162:12-20.
- Cote, P.J. Jr., and Gerin, J.L. (1983): Nonoverlapping antigenic sites of woodchuck hepatitis virus surface antigen and their cross-reactivity with ground squirrel hepatitis virus and hepatitis B virus surface antigen. *J. Virol.* 47:15-23.

- Craigen, W.J. and Caskey, C.T. (1986): Expression of peptide chain release factor 2 requires high-efficiency frameshift. *Nature* 322:273-275.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1:695-698.
- Dayhuff, T.J., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. (1986): Characterization of ribosomal frameshift events by protein sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 261:7491-7500.
- Debouck, C., Gorniak, J.G., Strickler, J.E., Meek, T.D., Metcalf, B.W. and Rosenberg, M. (1987): Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:8903-8906.
- Dejean, A., Vitvitski, L., Brechot, C., Trepo, C., Tiollais, P. and Charnay, P. (1982): Presence and state of woodchuck hepatitis virus DNA in liver and serum of woodchucks: further analogies with human hepatitis B virus. *Virology* 121:195-199.
- Dejean, A., Sonigo, P., Wain-Hobson, S. and Tiollais, P. (1984): Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5350-5354.
- Dejean, A., Bougueleret, L., Grzeschik, K.H. and Tiollais, P. (1986): Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to *v-erb-A* and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 322:70-72.
- Delius, H., Gough, N.M. and Cameron, C.H. (1983): Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* 47:337-343.
- Dienstag, J.L. (1984): Immunologic mechanisms in chronic viral hepatitis. Edited by Vyas, G.N., Dienstag, J.L. and Hoofnagle, J.H.: *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Fla, Grune & Stratton, pp.135-166.
- Di Marzo Veronese, F., Copeland, T.D., De Vico, A.L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R.C. and Sarngadharan, M.G. (1986): Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* 231:1289-1291.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P. and Chambon, P. (1981): A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112:295-298.
- Dudley, F.J., Fox, R.A. and Sherlock, S. (1972): Cellular immunity and hepatitis-associated, Australia antigen liver disease. *Lancet* 1:723-726.
- Enders, G.H., Ganem, D. and Varmus, H. (1985): Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant. *Cell* 42:297-308.
- Enders, G.H., Ganem, D. and Varmus, H.E. (1987): 5'-terminal sequences influence the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNAs into polyribosomes and viral core particles. *J. Virol.* 61:35-41.

- Farza, H., Salmon, A.M., Hadchouel, M., Moreau, J.L., Babinet, C., Tiollais, P. and Pourcel, C. (1987): Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1187-1191.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Feitelson, M.A., Marion, P.L. and Robinson, W.S. (1981): Antigenic and structural relationships of the surface antigens of hepatitis B virus, ground squirrel hepatitis virus, and woodchuck hepatitis virus. *J. Virol.* 39:447-454.
- Fowler, M.J.F., Greenfield, C., Chu, C.-M., Karayannis, P., Dunk, A., Lok, A.S.F., Lai, C.F., Yeoh, E.K., Monjardino, J.P., Wankya, B.M. and Thomas, H.C. (1986): Integration of HBV-DNA may not be a prerequisite for the maintenance of the state of malignant transformation. *J. Hepatol.* 2:218-229.
- Fowler, M.J.F., Thomas, H.C. and Monjardino, J. (1986a): Cloning and analysis of integrated hepatitis B virus DNA of the adr subtype derived from a human primary liver cell carcinoma. *J. Gen. Virol.* 67:771-775.
- Fox, T.D. and Weiss-Brummer, B. (1980): Leaky +1 and -1 frameshift mutations at the same site in a yeast mitochondrial gene. *Nature* 288:60-63.
- Franck, A., Guillaud, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980): Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21:285-294.
- Fu, X.-X., Su, C.Y., Lee, Y., Hintz, R., Biempica, L., Snyder, R. and Rogler, C.E. (1988): Insulin-like growth factor II expression and oval cell proliferation associated with hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus carriers. *J. Virol.* 62:3422-3430.
- Fuetterer, J. and Hohn, T. (1987): Involvement of nucleocapsids in reverse transcription: a general phenomenon? *TIBS* 12:92-95.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. and Charnay, P. (1979): Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E.coli. *Nature* 281:646-650.
- Galibert, F., Chen, T.N. and Mandart, E. (1982): Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: Comparison with the hepatitis B virus sequence. *J. Virol.* 41:51-65.
- Ganem, D. and Varmus, H.E. (1987): The molecular basis of the hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.* 56:651-693.
- Garcia, P.D., Ou, J.H., Rutter, W.J. and Walter, P. (1987): Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. 1987 meeting on hepatitis viruses, Cold Spring Harbor, New York.
- Gerlich, W.H. and Robinson, W.S. (1980): Hepatitis B virus contains protein attached to the 5'terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801-809.

- Graves, M.C., Lim, J.J., Heimer, E.P. and Kramer, R.A. (1988): An 11-kDa form of human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* is sufficient for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2449-2453.
- Gordon, K., Pfeiffer, P., Fütterer, J. and Hohn, T. (1988): In vitro expression of cauliflower mosaic virus genes. *EMBO J.* 7:309-317.
- Gronemeyer, H.B., Turcotte, B., Quirin-Stricker, C., Bocquel, M., Meyer, M., Jeltsch, J., Lerouge, T., Garnier, J. and Chambon, P. (1987): The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis. *EMBO J.* 6:3985-3994.
- Gust, I.D., Burrell, C.J., Coulepis, A.G., Robinson, W.S. and Zuckerman, A.J. (1986): Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology* 25:14-29.
- Haeuptle, M.-T., Frank, R. and Dobberstein, B. (1986): Translation arrest by oligonucleotides complementary to mRNA coding sequences yields polypeptides of predetermined length. *Nucl. Acids Res.* 14:1427-1448.
- Hansen, J., Schulze, T., Mellert, W. and Mölling, K. (1988): Identification and characterization of HIV-specific RNaseH by monoclonal antibody. *EMBO J.* 7:239-243.
- Hayward, W.S., Neel, B.G. and Astrin, S.M. (1981): Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 290:475-480.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. and Gerlich, W.H. (1984): Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J. Virol.* 52:396-402.
- Heijne, G.v. (1985): Signal sequences: the limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184:99-105.
- Herbert, W.J. (1973): Laboratory animal techniques for immunology. Edited by Weir, D.M.: *Handbook of Experimental Immunology*, Vol.3. Blackwell, Oxford.
- Herrmann, R., Neugebauer, K., Pirkel, E., Zentgraf, H.W. and Schaller, H. (1980): Conversion of bacteriophage fd into an efficient single-stranded DNA vector-system. *Mol. Gen. Genet.* 177:231-242.
- Hino, O., Shows, T.B. and Rogler, C.E. (1987): Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma at chromosome 17; 18 translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8338-8342.
- Hoofnagle, J.H. and Alter, H.J. (1984): Chronic viral hepatitis. Edited by Vyas, G.N., Dienstag, J.L. and Hoofnagle, J.H.: *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Fla, Grune & Stratton, pp.97-113.
- Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1981): Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828.
- Howard, C.R. (1986): The biology of hepadnaviruses. *J. Gen. Virol.* 67:1215-1235.
- Hsu, T.-y., Möröy, T., Etienne, J., Louise, A., Trepo, C., Tiollais, P. and Buendia, M.-A. (1988): Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* 55:627-635.

- Ish-Horowicz, D. and Burke, J.F. (1981): Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids Res.* 9:2989-2998.
- Jacks, T. and Varmus, H.E. (1985): Expression of the rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230:1237-1242.
- Jacks, T., Townsley, K., Varmus, H.E. and Majors, J. (1987): Two efficient ribosomal frameshifting events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus gag-related polyproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4298-4302.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Varmus, H.E. (1988): Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331:280-283.
- Jacks, T., Madhani, H.T., Masiarz, F.R. and Varmus, H.E. (1988a): Signals for ribosomal frameshifting in the rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* 55:447-458.
- Jacquemin, P.C., Saxinger, C., Gallo, R.C., Hardy, W.D. and Essex, M. (1978): Antibody response in cats to feline leukemia virus reverse transcriptase under natural conditions of exposure to the virus. *Virology* 91:472-476.
- Jean-Jean, O., Levrero, M., Will, H., Perricaudet, M. and Rossignol, J.-M. (1988): Expression mechanism of the hepatitis B virus C gene and biosynthesis of HBe antigen. *Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.*
- Johnson, M.S., McClure, M.A., Feng, D.-F., Gray, J. and Doolittle, R.-F. (1986): Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7648-7652.
- Joshi, S., Neeleman, L., Pleij, C.W.A., Haenni, A.L., Chapeville, F., Bosch, L. and van Vloten-Doting, L. (1984): Nonstructural alfalfa mosaic virus RNA-coded proteins present in tobacco leaf tissue. *Virology* 139:231-242.
- Kanaya and Crouch (1988): DNA sequence of the gene coding for Escherichia coli ribonucleaseH. *J. Biol. Chem.* 258:1276-1281.
- Kaneko, S. and Miller, R.H. (1988): X-region-specific transcripts in mammalian hepatitis B virus-infected liver. *J. Virol.* 62:3979-3984.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Robinson, W.S. (1973): DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* 12:995-1005.
- Kay, A., Mandart, E., Trepo, C. and Galibert, F. (1985): The HBV HBx gene expressed in E.coli is recognized by sera from hepatitis patients. *EMBO J.* 4:1287-1292.
- Klinkert, M.-Q., Theilmann, L., Pfaff, E. and Schaller, H. (1986): Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 58:522-525.
- Kodama, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H. and Murakami, S. (1985): Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses. *J. Virol.* 56:978-986.

- Korba, B.E., Wilson, V.L. and Yoakum, G.H. (1985): Induction of hepatitis B virus core gene in human cells by cytosine demethylation in the promoter. *Science* 228:1103-1106.
- Korba, B.E., Wells, F., Tennant, B.C., Yoakum, G.H., Purcell, R.H. and Gerin, J.L. (1986): Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: woodchuck and chimpanzee model of viral hepatitis. *J. Virol.* 58:1-8.
- Korba, B.E., Wells, F., Tennant, B.C., Cote, P.J. and Gerin, J.L. (1987): Lymphoid cells in the spleens of woodchuck hepatitis virus infected woodchucks are a site of active viral replication. *J. Virol.* 61:1318-1324.
- Korba, B.E., Cote, P.J. and Gerin, J.L. (1988a): Mitogen-induced replication of woodchuck hepatitis virus in cultured peripheral blood lymphocytes. *Science* 241:1213-1216.
- Korba, B.E., Gowans, E.J., Wells, F.V., Tennant, B.C., Clarke, R. and Gerin, J.L. (1988): Systemic distribution of woodchuck hepatitis virus in the tissues of experimentally infected woodchucks. *Virology* 165:172-181.
- Koshy, R., Koch, S., Freytag v. Loringhoven, A., Kahmann, R., Murray, K. and Hofschneider, P.H. (1983): Integration of hepatitis B virus DNA: evidence for integration in the single-stranded gap. *Cell* 34:215-223.
- Kozak, M. and Shatkin, A.J. (1977): Sequences and properties of two ribosome binding sites from the small size of reovirus messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 252:6895-6908.
- Kozak, M. (1983): Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* 47:1-45.
- Kozak, M. (1985): Regulation of protein synthesis in virus-infected cells. *Adv. Virus Res.* 31:229-292.
- Kozak, M. (1988): A profusion of controls. *J. Cell Biol.* 107:1-7.
- Kramer, W. and Fritz H.-J. (1987): Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. *Meth. Enzymol.* 154 (Vol E):350-366.
- Kräusslich, H.-G., Schneider, H., Zybarth, G., Carter, C.A. and Wimmer, E. (1988): Processing of in vitro-synthesized gag precursor proteins of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by HIV proteinase generated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 62:4393-4397.
- Kräusslich, H.-G. and Wimmer, E. (1988a): Viral proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57:701-754.
- Küpper, H., Delamarter, J., Otto, B. and Schaller, H. (1982): Expression of major foot and mouth disease antigen in *E.coli*. Edited by Ikeda, Y. and Beppu, T.: *Proceedings of the IVth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*. Kadansha Ltd., Tokyo, pp.222-226.
- Kurland, C.G. (1979): Reading frame errors on ribosomes. Edited by Celis, J.E. and Smith, J.D.: *Nonsense Mutations and tRNA Suppressors*. Academic Press, London, pp.97-108.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Landers, T.A., Greenberg, H.B. and Robinson, W.S. (1977): Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J. Virol.* 23:368-376.
- Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975): Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56:335-341.
- Laurence, J., Saunders, A. and Kulkosky, J. (1987): Characterization and clinical association of antibody inhibitory to HIV reverse transcriptase activity. *Science* 235:1501-1504.
- Le Grice, S.F.J., Mills, J. and Mous, J. (1988): Active site mutagenesis of the AIDS virus protease and its alleviation by trans complementation. *EMBO J.* 7:2547-2553.
- Lien, J.-M., Aldrich, C.E. and Mason, W.S. (1986): Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J. Virol.* 57:229-236.
- Lien, J.-M., Petcu, D.J., Aldrich, C.E. and Mason, W.S. (1987): Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J. Virol.* 61:3832-3840.
- Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. and Scheele, G.A. (1987): Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6:43-48.
- Machida, A., Kishimoto, S. and Ohnuma, H. (1984): A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-s region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 86:910-918.
- Magnus, L.O. and Espmark, J.A. (1972): New specificities in australia antigen-positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J. Immunol.* 109:1017-1021.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marion, P.L., Oshiro, L., Regnery, D.C., Scullard, G.H. and Robinson, W.S. (1980): A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2941-2945.
- Mason, W.S., Seal, G. and Summers, J. (1980): A virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36:829-836.
- Mason, W.S., Taylor, J.M. and Hull, R. (1987): Retrovirus genome replication. Edited by Maramosch, K., Murphy, F. and Shatkin, A.J. In: *Advances in Virus Research*. Academic Press, Orlando, USA, pp.35-96.
- Matsubara, K., Nagaya, A., Fukushige, F., Fujiyama, A., Tsurimoto, T., Chisaka, O., Shinya, T. and Nakamura, T. (1985): Studies with junctions between integrated HBV-DNA and host chromosomal DNA. In: *Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*. Cold Spring Harbor Press, pp.82.
- Maynard, J.E., Berquist, K.R., Krushak, D.H. and Purcell, R.H. (1972): Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B. *Nature* 237:514-515.

- McLachlan, A., Milich, D.R., Raney, A.K., Riggs, M.G., Hughes, J.L., Sorge, J. and Chisari, F.V. (1987): Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: influences of pre-S and precore sequences. *J. Virol.* 61:683-692.
- Mellor, J., Fulton, S.M., Dobson, M.J., Wilson, W., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. (1985): A retrovirus-like strategy for expression of a fusion protein encoded by yeast transposon Ty1. *Nature* 313:243-246.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984): Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* 12:7035-7056.
- Miller, R.H. and Robinson, W.S. (1983): Integrated hepatitis B virus DNA sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PLC/PRF/5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2534-2538.
- Miller, R.H. and Robinson, W.S. (1986): Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2531-2537.
- Miller, R.H. (1987): Proteolytic self-cleavage of hepatitis B virus core protein may generate serum e antigen. *Science* 236:722-725.
- Möröy, T., Etienne, J., Trepo, C., Tiollais, P. and Buendia, M.A. (1985): Transcription of woodchuck hepatitis virus in the chronically infected liver. *EMBO J.* 4:1507-1514.
- Möröy, T., Marchio, A., Etienne, J., Trepo, C., Tiollais, P. and Buendia, M.-A. (1986): Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature* 324:276-279.
- Mondelli, M., Tedder, R.S., Ferns, B., Pontisso, P., Realdi, G. and Alberti, A. (1986): Differential distribution of hepatitis B core and E antigens in hepatocytes: analysis by monoclonal antibodies. *Hepatology* 6:199-204.
- Mous, J., Heimer, E.P. and Le Grice, S.F.J. (1988): Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type I polyprotein in *E.coli*. *J. Virol.* 62:1433-1436.
- Neel, B.G., Hayward, W.S., Robinson, H.L., Fang, J. and Astrin, S. (1981): Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell* 23:323-334.
- Ogston, C.W., Jonak, G., Rogler, C., Astrin, S. and Summers, J. (1982): Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinoma of woodchucks. *Cell* 29:385-394.
- Onodera, S., Ohori, H., Yamaki, M. and Ishida, N. (1982): Electron microscopy of human hepatitis B virus cores by negative staining-carbon film technique. *J. Med. Virol.* 10:147-152.
- Ou, J.-H., Lau, J. O. and Rutter, W.J. (1986): Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1578-1582.

- Ou, J.-H. and Rutter, W.J. (1987): Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the pre-S1 protein. *J. Virol.* 61:782-786.
- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., McKay, P., Leadbetter, G. and Murray, K. (1979): Hepatitis B virus genes and their expression in *E.coli*. *Nature* 282:575-579.
- Patzer, E.J., Nakamura, G.R. and Yaffe, A. (1984): Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J.Virol.* 51:346-353.
- Persing, D.H., Varmus, H.E. and Ganem, D. (1985): A frameshift mutation in the pre-s region of human hepatitis B virus genome allows production of surface antigen particles but eliminates binding to polymerized albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3440-3444.
- Persing, D.H., Varmus, H.E. and Ganem, D. (1986): Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science* 234: 1388-1391.
- Persing, D.H., Varmus, H.E. and Ganem, D. (1986a): Antibodies to pre-S and X determinants arise during natural infection with ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* 60:177-184.
- Peterson, D.L. (1988): The structure of hepatitis B surface antigen and its antigenic sites. *BioAssays* 6:258-262.
- Pfaff, E., Salfeld, J., Gmelin, K., Schaller, H. and Theilmann, L. (1987): Synthesis of the X-protein of hepatitis B virus in vitro and detection of anti-X antibodies in human sera. *Virology* 158:456-460.
- Philipson, L., Andersson, P., Olshevsky, U., Weinberg, R., Baltimore, D. and Gesteland, R. (1978): Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA. *Cell* 13:189-199.
- Popper, H., Roth, L., Purcell, R.H., Tennant, B.C. and Gerin, J.L. (1987): Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:866-870.
- Pugh, J.C., Sninsky, J.J., Summers, J.W. and Schaeffer, E. (1987): Characterization of a pre-S polypeptide on the surfaces of infectious avian hepadnavirus particles. *J. Virol.* 61:1384-1390.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starchich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S.R., Jr., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1985): Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313, 277-283.
- Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1981): Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the p_L promoter of coliphage lambda. *Gene* 15:81-93.
- Rogler, C.E. and Summers, J. (1982): Novel forms of woodchuck hepatitis virus DNA isolated from chronically infected woodchuck liver nuclei. *J. Virol.* 44:852-863.
- Rogler, C.E. and Summers, J. (1984): Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from a chronically infected liver. *J. Virol.* 50:832-837.

- Rogler, C.E., Sherman, M., Shafritz, D.A., Summers, J., Shows, T.B., Henderson, A. and Kew, M. (1985): Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma. *Science* 230:319-322.
- Romet-Lemonne, J.L., McLane, M.F., Elfassi, E., Haseltine, W.A. Azocar, J. and Essex, M. (1983): Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells. *Science* 221:667-669.
- Roossinck, M.J., Jameel, S., Loukin, S.H. and Siddiqui, A. (1986): Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 6:1393-1400.
- Salfeld, J. (1985): Genprodukte des Hepatitis B Virus: Struktur, Zuordnung zum Genom und Biosynthese. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Schaeffer, E., Snyder, R.L. and Sninsky, J.J. (1986): Identification and localization of pre-S encoded polypeptides from woodchuck and ground squirrel hepatitis viruses. *J. Virol.* 57:173-182.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Schlicht, H.J., Salfeld, J. and Schaller, H. (1987): The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation. *J. Virol.* 61:2208-2212.
- Schlicht, H.J., Radziwill, G. and Schaller, H. (1989): Synthesis and encapsidation of the duck hepatitis B virus reverse transcriptase does not require the formation of core/polymerase fusion proteins. *Cell* 56:85-92.
- Schneider, J. and Kent, S.B.H. (1988): Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease. *Cell* 54:363-368.
- Schödel, F., Sprengel, R., Weimer, T., Fernholz, D., Schneider, R. and Will, H. (1989): Animal hepatitis B viruses. *Adv. Viral Oncol.* 8:72-103.
- Schwartz, D.E., Tizard, R. and Gilbert, W. (1983): Nucleotide sequence of rous sarcoma virus. *Cell* 32:853-869.
- Seeger, C., Ganem, D. and Varmus, H.E. (1984): Nucleotide sequence of an infectious molecularly cloned genome of ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* 51:367-375.
- Seeger, C., Ganem, D. and Varmus, H.E. (1986): Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232:477-484.
- Seeger, C. (1988): Genetic analysis of the hepadnavirus X gene. 1988 meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, San Diego.

- Shaul, Y., Rutter, W.J. and Laub, O. (1985): A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 4:427-430.
- Shaul, Y., Ben-Levy, R. and De-Medina, T. (1986): High affinity binding site for nuclear factor I next to the hepatitis B virus S gene promoter. *EMBO J.* 5:1967-1971.
- Shih, C., Burke, K., Chou, M.-J., Zeldis, J.B., Yang, C.-S., Lee, C.-H., Isselbacher, K.J., Wands, J.R. and Goodman, H.M. (1987): Tight clustering of human hepatitis B virus integration sites in hepatomas near a triple-stranded region. *J. Virol.* 61:3491-3498.
- Shinnick, T.M., Lerner, R.A. and Sutcliffe, J.G. (1981): Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature* 293:543-548.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spandau, D.F. and Lee, C.-H. (1988): Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 62:427-434.
- Spanos, A. and Hübscher, U. (1983): Recovery of functional proteins in sodium dodecyl sulfate gels. *Meth. Enzymol.* 91:263-277.
- Sprang, S.R., Acharya, K.R., Goldsmith, E.J., Stuart, D.I., Varvill, K., Fletterick, R.J., Madsen, N.B. and Johnson, L.N. (1988): Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* 336:215-219.
- Sprengel, R., Kuhn, C., Will, H. and Schaller, H. (1985): Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes. *J. Med. Virol.* 15:323-333.
- Sprengel R., Kaleta, E.F., and Will, H. (1988): Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* 62:3832-3839.
- Stahl, S., Mackay, P., Megazin, M., Bruce, S.A. and Murray, K. (1982): Hepatitis B virus core antigen: synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1606-1610.
- Stanssens, P., McKeown, Y., Friedrich, K. and Fritz, H.-J. (1986): Oligonucleotide-directed construction of mutations by the gapped duplex DNA method using the pMa/c phasmid vectors. Unveröffentlichtes Manuskript.
- Strandring, D.N., Ou, J.H. and Rutter, W.J. (1986): Assembly of viral particles in *Xenopus* oocytes: Pre-surface-antigens regulate secretion of the hepatitis B viral surface envelope particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9338-9342.
- Strandring, C.H., Ou, J.H., Walter, M. and Rutter, W.J. (1987): Expression of hepatitis B virus antigens in *Xenopus laevis* oocytes. 1987 meeting on hepatitis B viruses, Cold Spring Harbor, New York.
- Stemler, M., Hess, J., Braun, R., Will, H., and Schröder, C.H. (1988): Serological evidence for expression of the polymerase gene of human hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 69:689-693.

- Stibbe, W. and Gerlich, W.H. (1983): Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 46:626-628.
- Strebel, K. (1985): Charakterisierung von Genprodukten des Maul- und Klauenseuche Virus mit Antisera gegen bakteriell synthetisierte Fusionsproteine. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Summers, J., Smolec, J.M. and Snyder, R. (1978). A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4533-4537.
- Summers, J. and Mason, W.S. (1982): Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-415.
- Summers, J., Ogston, C.W., Jonak, G.J., Astrin, S.M., Tyler, G.V. and Snyder, R.L. (1984): Woodchuck hepatitis virus-induced hepatomas contain integrated and closed circular viral DNAs. Edited by Giraldo, G. and Beth, E.: *The Role of Viruses in Human Cancer*. Vol.II. Elsevier Science Publishers B.V., pp.213-225.
- Sureau, C., Romet-Lemonne, J.L., Mullins, J.I. and Essex, M. (1986): Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47:37-47.
- Szmuness, W. (1978): Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence of a causal association. *Prog. Med. Virol.* 24:40-49.
- Tabor, S. and Richardson, C.C. (1987): DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4767-4771.
- Takamashi, K., Machida, A., Funatsu, G., Nomura, M., Usuda, S., Aoyagi, S., Tachibana, K., Miyamoto, H., Imai, M., Nakamura, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1983): Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J. Immunol.* 130:2903-2907.
- Tanese, N. and Goff, S.P. (1988): Domain structure of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNaseH activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1777-1781.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M. and Plummer, T.H. (1985): Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochem.* 24:4665-4671.
- Toh, H., Hayashida, H. and Miyata, T. (1983): Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerase of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 305:827-829.
- Toh, H., Kikuno, R., Hayashida, H., Miyata, T., Kugimiya, W., Inouye, S., Yuki, S. and Saigo, K. (1985): Close structural resemblance between putative polymerase of a Drosophila transposable genetic element 17.6 and pol gene product of Moloney murine leukemia virus. *EMBO J.* 4:1267-1272.
- Tokino, T., Fukushige, S., Nakamura, T., Nagaya, T., Murotsu, T., Shiga, K., Aoki, N. and Matsubara, K. (1987): Chromosomal translocation and inverted duplication associated with integrated hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma. *J. Virol.* 61:3848-3854.

- Trifonov, E.N. (1987): Translation framing code and frame-monitoring mechanism as suggested by the analysis of mRNA and 16S rRNA nucleotide sequences. *J. Mol. Biol.* 194:643-652.
- Tsurimoto, T., Fujiyama, A. and Matsubara, K. (1987): Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:444-448.
- Twu, J.-S. and Schloemer, R.H. (1987): Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.* 61:3448-3453.
- Uy, A., Bruss, V., Gerlich, W.H., Köchel, H.G. and Thommsen, R. (1986): Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. *Virology* 155:89-96.
- Valenzuela, P., Quiroga, M. and Zaldivar, J. (1980): The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. Edited by Fields, B., Jaenisch, R. and Fox, C.F.: *Animal Virus Genetics*. New York, Academic Press, pp.57-70.
- Varmus, H.E. and Swanstrom, R. (1982): Replication of retroviruses. Edited by Weiss, R., Teich, H., Varmus, H.E. and Coffin, J.: *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.369-512.
- Voytas, D.F. and Ausubel, F.M. (1988): A copia-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 336:242-244.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. and Alizon, M. (1985): Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40:9-17.
- Walter, P. and Lingappa, V.R. (1986): Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 2:499-516.
- Weimer, T. (1985): Expressionskontrolle von Nukleokapsidproteinen des humanen Hepatitis B Virus. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Weimer, T., Salfeld, J. and Will, H. (1987): Expression of the hepatitis B virus core gene in vitro and in vivo. *J. Virol.* 61:3109-3113.
- Weiss, R.B., Dunn, D.M., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. (1987): Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5, and +6 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol.LII. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.687-693.
- Weiss, R.B., Dunn, D.M., Dahlberg, A.E., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. (1988): Reading frame switch caused by base-pair formation between the 3'-end of 16S rRNA and the mRNA during elongation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 7:1503-1507.
- Werner, B.J., Smolec, J.M., Snyder, R. and Summers, J. (1979): Serological relationship of woodchuck hepatitis virus to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 32:314-322.
- Will, H., Cattaneo, R., Koch, H.-G., Darai, G. and Schaller, H. (1982): Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* 299:740-742.

- Will, H., Salfeld, J., Pfaff, E., Manso, C., Theilmann, L. and Schaller, H. (1986): Putative reverse transcriptase intermediates of human hepatitis B virus in primary liver carcinoma. *Science* 231:594-596.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. and Schaller, H. (1987): Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* 61:904-911.
- Wilson, W., Malim, M.H., Mellor, J., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M. (1986): Expression strategies of the yeast transposon Ty: a short sequence directs ribosomal frameshifting. *Nucl. Acids Res.* 14:7001-7016.
- Wu, K.D., Graves, D.C. and Ferrer, J.F. (1977): Inhibition of the reverse transcriptase of bovine leukemia virus by antibody in sera from leukemic cattle and immunological characterization of the enzyme. *Cancer Res.* 37:1438-1442.
- Yaginuma, K., Kobayashi, M., Yoshida, E. and Koike, K. (1985): Hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA: duplication of cellular flanking sequences at the integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4458-4462.
- Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. and Koike, K. (1987): Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2678-2682.
- Yaginuma, K., Kobayashi, H., Kobayashi, M., Morishima, T., Matsuyama, K. and Koike, K. (1987a): Multiple integration site of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma and chronic active hepatitis tissues from children. *J. Virol.* 61:1808-1813.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1985): Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1618-1622.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D., Smythers, G.W. and Oroszlan, S. (1986): Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis and in vitro processing of gag precursor polyproteins. *J. Virol.* 57:826-832.
- Yu, M.W., Finlayson, J.S. and Shih, W.-K. (1985): Interaction between various polymerized human albumins and hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 55:736-743.
- Zahm, P., Hofschneider, P.H. and Koshy, R. (1988): The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 3:169-177.
- Zerial, M., Huylebroeck, D. and Garoff, H. (1987): Foreign transmembrane peptides replacing the internal signal sequence of transferrin receptor allow its translocation and membrane binding. *Cell* 48:147-155.

Anhang

Insertion von Polylinkern in pEx30, pSP64 und pSP65

Die Expressionsplasmide pEx30a, b und c (E.Beck, ZMBH Heidelberg; Strebel, 1985) enthalten unter der Kontrolle des 'leftward' Promoters des Bakteriophagen Lambda die ersten 291 Basenpaare des MS2-Replikasegens mit anschließendem Polylinker zur Insertion von Fremd-DNA. Ein hitzelabiler *ci*-Repressor in den *E.coli* Stämmen 2136 und 537 erlaubt die Induktion der Proteinsynthese durch Erhöhen der Wachstumstemperatur von 28°C auf 42°C. Die entstehenden Fusionsproteine sind häufig aufgrund ihrer Unlöslichkeit durch eine Harnstoffextraktion leicht zu reinigen. Durch Deletion von einem bzw. fünf Nukleotiden am 3'-Ende des MS2-Replikasegens entstanden drei Vektoren a, b und c, die die Restriktionsschnittstellen in allen drei Leserastern enthalten (E.Beck; Strebel, 1985).

Durch Insertion der Oligonukleotide R1H3link1-4 wurden hier vielseitigere Polylinker eingeführt, die auch Erkennungsstellen für zwei Enzyme enthalten (*Sma*I und *Eco*RV), die glatte Plasmidenden erzeugen. Die Insertion dieser Linker in pSP64 und pSP65 (Melton et al., 1984) führte nicht nur neue Restriktionsschnittstellen ein, sondern auch Initiationskodons.

Die Plasmide pEx30a, b, c, pSP64 und pSP65 wurden mit *Eco*RI und *Hind*III geschnitten und mit 100fachem molarem Überschuß der Oligonukleotide R1H3link1 und R1H3link2 ligiert. Diese beiden Oligonukleotide sind komplementär und so konstruiert, daß sie die *Eco*RI-Schnittstelle deletieren, die *Hind*III-Schnittstelle aber erhalten (Abb.5.a). Die entstehenden Plasmide wurden mit pEx40a, b, c, pSP64-2 und pSP65-2 bezeichnet. Die Klonierung wurde durch Didesoxysequenzierung mit den Oligonukleotiden MS2-Oligo und pBR2094 (Abb.5.a) überprüft. Im zweiten Schritt wurden diese Plasmide mit *Hind*III linearisiert und die Oligonukleotide R1H3link3 und R1H3link4 inseriert. Diese sind ebenfalls komplementär und so aufgebaut, daß sie einen *Hind*III-Schnitt deletieren, den anderen erhalten. Da diese Klonierung ungerichtet war, entstanden nun jeweils zwei Plasmide mit diesem Linker in beiden Orientierungen (Abb.5.a), die durch Sequenzierung identifiziert wurden.

Die Abbildung 5.b zeigt die durch die Klonierung entstandenen Expressionsplasmide pEx40a-c, pEx41a-c und pEx42a-c mit dem jeweiligen MS2-Leseraster. Abb.5.c zeigt die Derivate von pSP64 und pSP65. Die Initiationskodons sind unterstrichen, die Sequenz beginnt beim ersten nach der Transkription auf der RNA enthaltenen Nukleotid.

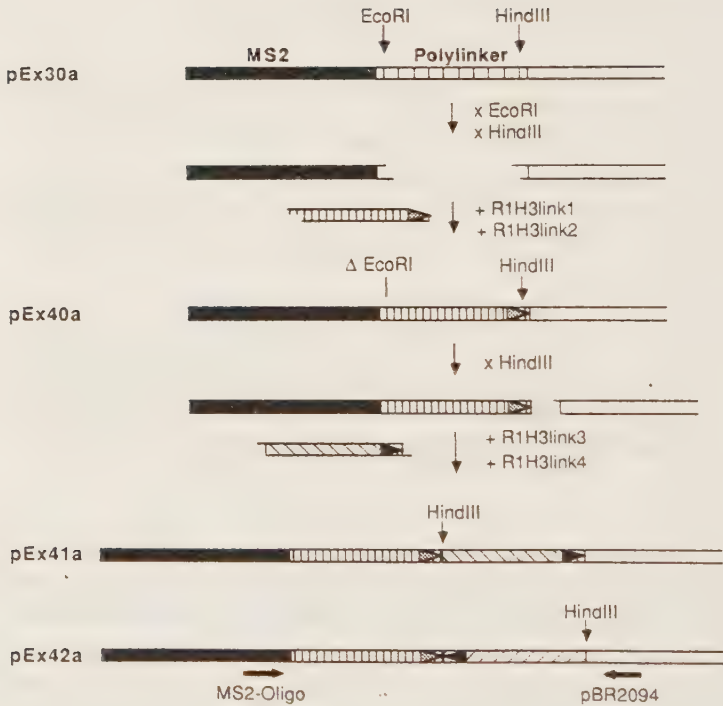


Abb.5. a) Insertion der Oligonukleotide R1H3link1-4 in pEx30a. Der Polylinker von pEx30a wurde durch Restriktion mit EcoRI und HindIII entfernt und durch die Oligonukleotide R1H3link1/R1H3link2 ersetzt. Im zweiten Schritt wurde in die erhaltene HindIII-Schnittstelle das Oligonukleotidpaar R1H3link3/R1H3link4 in beiden Orientierungen einkloniert. Die Lokalisation der zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide MS2-Oligo und pBR2094 ist angegeben.

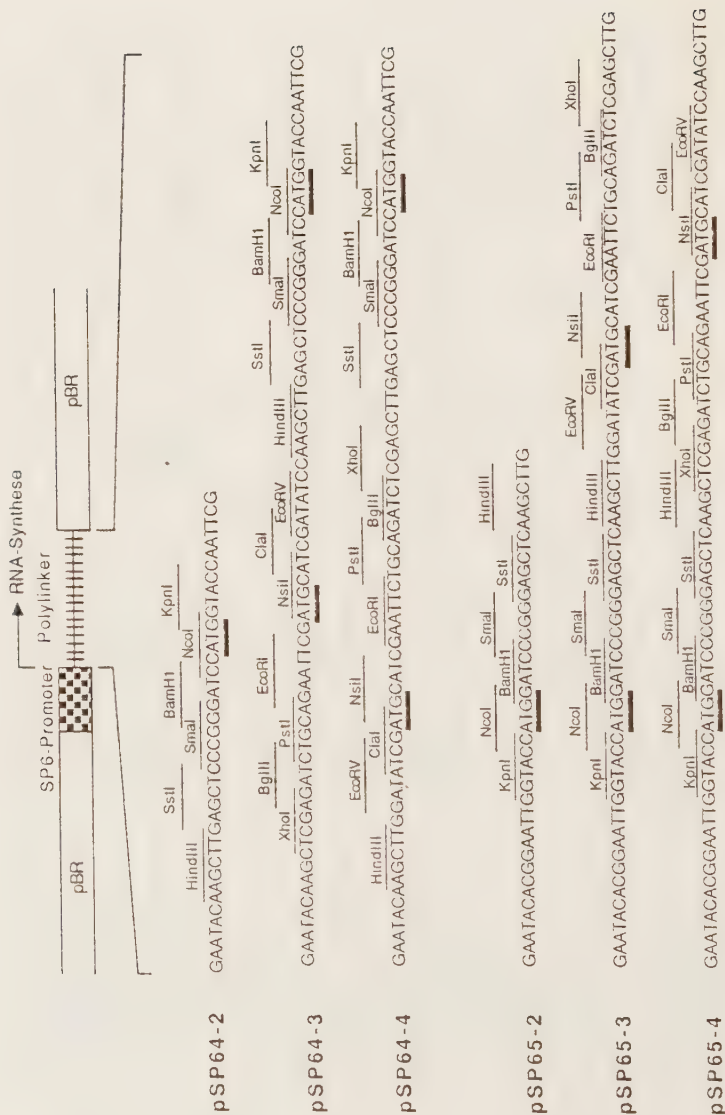


Abb.5.c) Derivate von pSP64 und pSP65

Abkürzungen

α	anti-
A	Adenin
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
anti-	Antikörper/-serum gegen
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
Ci	Curie
cpm	counts per minute
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpm	Zerfälle pro Minute
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunden
J	Jod (nur als ^{125}J -ProteinA)
Kb	Kilobasen
Kd	Kilodalton
Kan	Kanamycin
l	Liter
m	Milli-
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro-
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260nm

p...	Plasmid
pfu	plaque forming units
pmol	Pikomol
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Trishydroxyaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
U	Uracil
ÜN	über Nacht
V	Volt

Lebenslauf

Name:	Weimer
Vorname:	Thomas
Geburtsdatum:	26.02.1959
Geburtsort:	Heidelberg
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Hans Heinrich Weimer, technischer Angestellter i.R. geb.am 16.03.1929 Irmgard Marie Weimer geb. Weisbrod, Hausfrau geb. am 05.10.1934 wohnhaft in 6908 Wiesloch
Schulischer Werdegang:	1966-1969 Schillerschule Wiesloch 1969-1978 Gymnasium Wiesloch Abitur im Mai 1978
Wehrdienst:	1978-1980 Sanitätsbataillon 310, Hermeskeil
Hochschulausbildung:	1980-1985 Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Diplom 14.04.1986 seit Sommersemester 1986 Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

